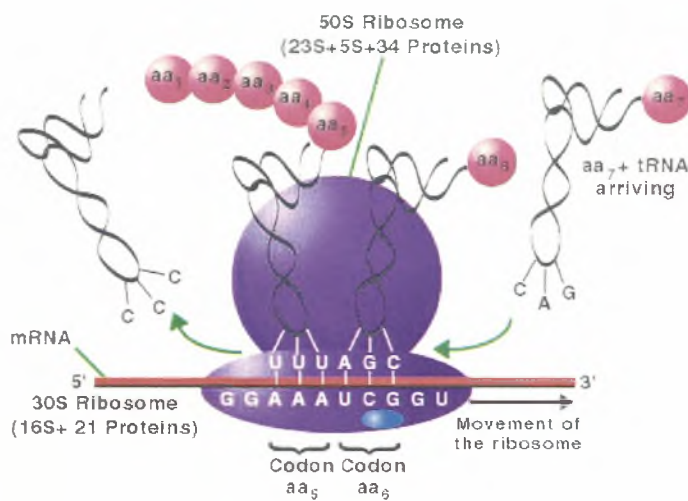


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ tRNA ΣΤΗΝ ΑΚΡΙΒΕΙΑ
ΤΗΣ ΑΠΟΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ mRNA



ΓΕΩΡΓΙΑ Δ. ΤΣΑΓΚΟΓΕΩΡΓΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 3994/1

Ημερ. Εισ.: 05-11-2004

Δωρεά: _____

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

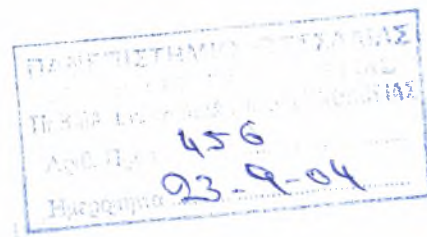
ΤΣΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075126

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον τομέα
Génétiqúe Moléculaire de la Traduction
στο Institut de Génétique et Microbiologie του Πανεπιστήμιου PARIS-SUD XI,
στην πόλη του Orsay της Γαλλίας
στη διάρκεια τριών μηνών-Μάρτιος έως Ιούνιος του 2004.
Επικεφαλής του εργαστηρίου και της παρούσας έρευνας ήταν
ο Καθηγητής κ. Jean-Pierre Rousset και επιβλέποντες οι
κα. Isabelle Hatin και κα. Marta Kwapisz.
Υπεύθυνος καθηγητής της εργασίας στο
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας στην Λάρισα
είναι ο Επίκουρος Καθηγητής κ. Κων/νος Σταθόπουλος.



Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

- κ. Κων/νο Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα)
- κ. Ζήση Μαμούρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα)
- κ. Γεώργιο Σίμο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής (Λάρισα)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|-----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| ABSTRACT | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 6 |
| Η ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ | 6 |
| ΑΝΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ- | |
| ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ | 6 |
| ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ -1 | 7 |
| ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ tRNA | 8 |
| ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ tRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ | 12 |
| ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ | |
| ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ | 13 |
| ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 14 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 17 |
| ΥΛΙΚΑ | 17 |
| ΜΕΘΟΔΟΙ | 18 |
| ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΟΡΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ | 18 |
| ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. coli</i> ΚΑΙ <i>S. cerevisiae</i> | 20 |
| ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ | 20 |
| ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ | 20 |
| ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΝΕΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΣΤΟ tRNA | 22 |
| ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i> | 23 |
| ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S. cerevisiae</i> | 23 |
| ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ <i>E. coli</i> | 24 |
| ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S. cerevisiae</i> ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ | |
| ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ | 25 |
| ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ | 25 |
| ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ | 25 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 27 |

| | |
|---|-----------|
| Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ U1257 ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΓΤΡΑΣΗΣ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ UGA ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ | 28 |
| Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ C2817 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΔΕΝ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ | 29 |
| Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 ΚΑΙ A2816 ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΙ ΤΟ ΛΟΓΟ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΤΑΝ ΑΥΤΑ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΙΔΙΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ | 30 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 33 |
| ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 & U1257 | 33 |
| ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΛΗΞΗΣ ΚΑΙ ΑΣΥΜΦΩΝΙΑ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΚΩΔΙΚΟΝΙΩΝ ΛΗΞΗΣ | 33 |
| ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 & A2816 | 34 |
| ΤΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ U2950 ΚΑΙ A2816 ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΔΙΑΔΡΑΜΑΤΙΖΟΥΝ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ | 35 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 38 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 39 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 43 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των επιπτώσεων της μεθυλίωσης του rRNA στην ακρίβεια της μετάφρασης στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Τις θέσεις στόχους μεθυλίωσης αποτελούν νουκλεοτίδια που φυσιολογικά δεν υπόκεινται μετα-μεταγραφική τροποποίηση. Η ακρίβεια της μετάφρασης μετρήθηκε βάση του επιπέδου στο οποίο το ριβόσωμα μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης και δεν αναγνωρίζει το σήμα τερματισμού που τα κωδικόνια λήξης συνθέτουν στο μεταφραζόμενο mRNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία περιείχαν δυο γονίδια ενζύμων αναφοράς στα οποία παρεμβάλλονται σήματα μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης και λήξης, αντίστοιχα. Για την πρόκληση των νέων μεθυλίωσεων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί φορείς που περιέχουν «οδηγούς» αλληλουχίες RNA για τη μεθυλίωση τεσσάρων καταλοίπων στον κεντρικό βρόγχο του ενεργού κέντρου της πεπτιδυλτρανσφεράσης και ενός καταλοίπου στο κέντρο της GTPάσης της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας. Κατά αυτόν τον τρόπο λοιπόν, διαπιστώθηκε ότι η μεθυλίωση έχει ποικίλες επιδράσεις στην ακρίβεια της αποκωδικοποίησης του mRNA καθώς σε δύο των περιπτώσεων επηρεάζει την λειτουργία της μετάφρασης συνολικά, και στις υπόλοιπες αυξάνει το επίπεδο αναποτελεσματικότητας του σήματος λήξης TGA. Τέλος, σε μία περίπτωση μεθυλίωσης δεν παρατηρήθηκε καμία επιρροή.

ABSTRACT

The subject of the present project is the study of the influence of rRNA methylation at the accuracy of decoding in *Saccharomyces cerevisiae*. The methylations occurred in sites that normally do not go through post-transcriptional modifications. The accuracy of decoding was estimated by determining the level in which ribosome undergoes a non-canonical translation event, such as translational frameshift-1 and termination readthrough. For this purpose, dual-gene reporter vectors, which contained recoding sequences, were used in order to determine the accuracy of translation. In addition constructs called novel guide snoRNA vectors were used to target methylation in four sites in PTase central loop region and one in GTPase center of the large ribosomal subunit. The results argue that methylation of rRNA in novel sites has a variety of effects in the accuracy of decoding. Methylation of two nucleotides led to a global effect in the translation process, while two other resulted in an increase of the TGA readthrough phenomenon. Finally there was a case where no influence was observed.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Για την επιτυχή αποκωδικοποίηση του μηνύματος που φέρει το mRNA είναι απαραίτητη η ακριβής διεξαγωγή όλων των σταδίων της μετάφρασης-έναρξης, επιμήκυνση & λήξη. Εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι θεμελιώδεις κανόνες που διέπουν την εν λόγω πορεία παρακάμπτονται. Όλα τα φαινόμενα που δεν εντάσσονται στο πλαίσιο που ορίζουν οι κανόνες αυτοί, καλούνται λάθη και διακρίνονται σε τυχαία και μη τυχαία ή προγραμματισμένα. Η διαφορά των λαθών αυτών έγκειται στην προέλευση τους.

Τα μη τυχαία ή αλλιώς προγραμματισμένα λάθη πυροδοτούνται κυρίως από μηνύματα που εμπεριέχονται στο mRNA (*cis*-παράγοντες). Στα προγραμματισμένα λάθη εμπίπτουν τα φαινόμενα κατά τα οποία το ριβόσωμα παραλείπει την αποκωδικοποίηση κάποιων κωδικονίων προχωρώντας σε επόμενα (*hopping*), μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης (*frameshift* ± 1) ή/και αδυνατεί να τερματίσει τη μετάφραση (*readthrough*). Στα τυχαία περιλαμβάνονται λάθη όπως η τοποθέτηση μη συγγενούς ή σχεδόν συγγενούς αμινοακυλωμένου μορίου tRNA (*aa-tRNA*) έναντι ενός κωδικονίου, η ατελής συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης, η πρόωρη διακοπή της μετάφρασης (φαινόμενο “*drop-off*”).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η συχνότητα της μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης κατά ένα νουκλεοτίδιο μείον του τρέχοντος και της αναποτελεσματικότητας τερματισμού της μετάφρασης.

ΑΝΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ- ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ

Η λήξη της μετάφρασης λαμβάνει χώρα όταν το ριβόσωμα συναντήσει και αναγνωρίσει ένα σήμα λήξης. Παρ' όλα αυτά, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες άνωθεν και κάτωθεν του κωδικονίου λήξης επιτρέπουν την τοποθέτηση ενός κατασταλτικού μορίου tRNA. Κατά συνέπεια, το ριβόσωμα συνεχίζει την διαδικασία επιμήκυνσης μέχρι το επόμενο σήμα τερματισμού. Το φαινόμενο αυτό διακρίνεται σε δύο τύπους.

Ο πρώτος αφορά την ενσωμάτωση μιας τροποποιημένης σερίνης έναντι του κωδικονίου λήξης και έχει ταυτοποιηθεί σε αρκετά κυτταρικά γονίδια (Driscoll M.D and Copeland R. P., 2003). Αυτός ο συγκεκριμένος τύπος του φαινομένου απαιτεί την παρουσία ενός συγκεκριμένου παράγοντα επιμήκυνσης καθώς και ενός ειδικού μορίου tRNA.

Ο δεύτερος τύπος εμπλέκει τη φυσική μηχανή πρωτεϊνοσύνθεσης και οδηγεί στη ενσωμάτωση αμινοξέων όπως τρυπτοφάνη, γλουταμίνη, σερίνη ή ακόμα και τυροσίνη στην νεοσυστατή πεπτιδική αλυσίδα στο επίπεδο του κωδικονίου λήξης (Fearon et al., 1994, Weiss et al., 1987). Αυτός ο δεύτερος τύπος αναποτελεσματικού τερματισμού έχει διαπιστωθεί σε

πλήθος ιών των φυτών (Beier et al., 1984, Meulewaeter et al., 1990, Miller et al., 1988, Ugaki et al., 1991) και θηλαστικών (Feng et al., 1989, Yoshinaka et al., 1985) αλλά μέχρι πρότινος σε κανένα κυτταρικό γονίδιο ευκαρυωτών ή και προκαρυωτών (Namy O. et al, 2004).

Οι παράγοντες τερματισμού βρίσκονται σε μια διαρκή δυναμική ισορροπία με μόρια tRNA ικανά να αναγνωρίσουν τα κωδικόνια λήξης. Δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα μηχανισμός επιδιόρθωσης των λαθών της λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης, οπότε και η ακρίβεια της μετάφρασης σε αυτό το επίπεδο εξαρτάται άμεσα από την ταχύτητα και την εξειδίκευση των παραγόντων λήξης για την αναγνώριση των αντίστοιχων κωδικονίων. Αν το μη νοηματικό κωδικόνιο λήξης βρίσκεται σε περιοχή δύσκολα προσβάσιμη από τους παράγοντες λήξης τότε η ισορροπία θα κλίνει υπέρ των κατασταλατικών μορίων tRNA και η μετάφραση θα συνεχιστεί. Συνολικά από έρευνες πάνω στο θέμα έχει βρεθεί ότι ο καθοριστικός παράγοντας για την επαγωγή του φαινομένου είναι η 5' νουκλεοτιδική αλληλουχία άνωθεν του κωδικονίου λήξης καθώς και η βάση μετά από αυτό (Namy O. et al, 2001).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αναποτελεσματικού τερματισμού της μετάφρασης, είναι εκείνο που επιτρέπει την έκφραση μιας RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης στον ιό της μωσαϊκής του καπνού (TMV, Tobacco Mosaic Virus). Το 1991, η ερευνητική ομάδα του Skuzeski έδειξε ότι τα 6 νουκλεοτίδια CCAUUA κάτωθεν του κωδικονίου λήξης UAG διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην επαγωγή του φαινομένου. Το μοτίβο που προάγει το μέγιστο της αναποτελεσματικότητας του σήματος λήξης είναι η αλληλουχία CARYYA (R= πουρίνες, Y= πυριμιδίνες).

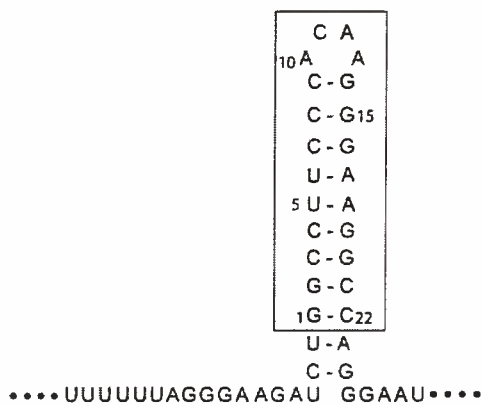
ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ -1

Η μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης σε ένα εναλλακτικό πλαίσιο μπορεί να λάβει χώρα είτε κατά την φάση της επιμήκυνσης είτε κατά τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τυχαία λάθη που προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης συμβαίνουν σπάνια, σε αντίθεση με τα προγραμματισμένα. Υπάρχουν προγραμματισμένα σήματα που είναι δυνατό να επάγουν περισσότερο του 50% των ριβοσωμάτων να μεταβάλλουν το πλαίσιο ανάγνωσης. Οι γενικές μορφές του φαινομένου εμπλέκουν την ολίσθηση μορίων tRNA και είναι εκτενώς μελετημένες σε ιούς, ρετροτρανσποζόνια της *Drosophila* και μεταθετά στοιχεία των βακτηρίων (Chandler and Fayer 1993, Atkins et al 2001, Brierley and Pemell 2001, Stahl et al 2001, Plant et al 2003).

Για την πραγμάτωση της μετατόπισης απαιτούνται δύο σήματα. Το πρώτο και καθοριστικό είναι μια ειδική ακολουθία νουκλεοτιδίων (slippery sequence) στο μηνυματοφόρο mRNA. Αυτή επάγει τη λανθασμένη αλληλεπίδραση και ολίσθηση των μορίων tRNA στα κωδικόνια. Το δεύτερο σήμα αποτελούν παράγοντες που προκαλούν ριβοσωμικές παύσεις, όπως για παράδειγμα είναι μια αργά αποκωδικοποιούσα ακολουθία στο mRNA ή ένα

κωδικόνιο λήξης. Εναλλακτικά συναντώνται διάφορες δευτεροταγείς δομές φουρκέτας (stem-loop) ή ψευδοκόμβων που δρουν ως προαγωγείς του φαινομένου.

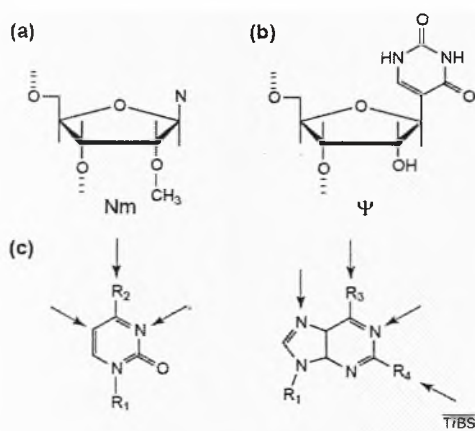
Παράδειγμα αποτελεί η έκφραση του γονιδιώματος του ιού HIV-1. Μια επταμερής ακολουθία στο mRNA, UUUUUUA (Jacks et al 1988, Staple W.D. and Butcher S.E. 2003), αποτελεί το πρώτο σήμα και μια δομή φουρκέτας (stem-loop) αποτελεί τον προαγωγέα (δεύτερο σήμα) που τελικά επάγει την έκφραση του gag-pol πολυπεπτιδίου (εικ. 1) και τελικά την έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης.



Εικόνα 1: Τα δύο σήματα μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης -1. Η ειδική αλληλουχία (υπογράμμιση) και η δομή φουρκέτας (πλαίσιο) επάγουν την έκφραση ενός σύνθετου πολυπεπτιδίου gag-pol. Το γονίδιο gag κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη του καλύμματος του ιού ενώ το pol για την αντίστροφη μεταγραφάση.

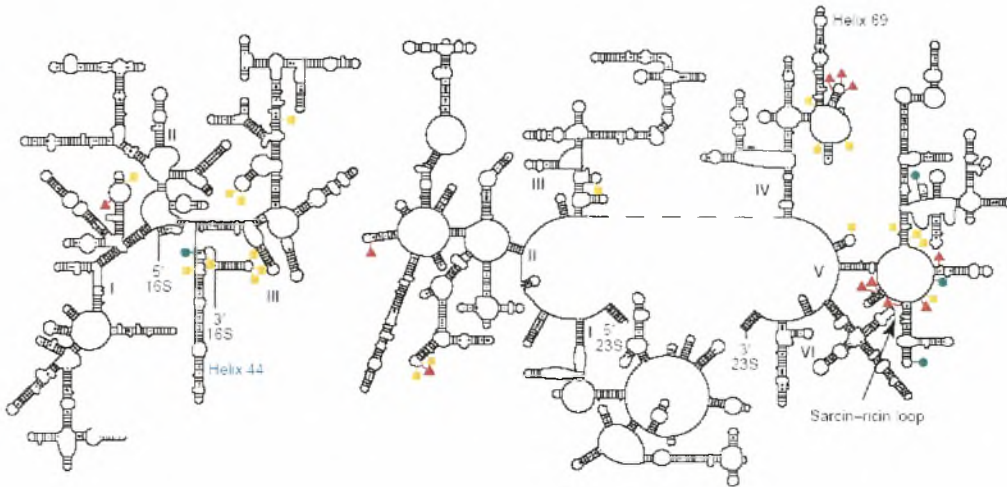
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ rRNA

Τρεις είναι οι κύριοι τύποι τροποποιήσεων που υπόκεινται τα νουκλεοτιδία του rRNA. Πρώτον η μετατροπή της ουριδίνης σε ψευδοουριδίνη (Ψ), δεύτερον η μεθυλίωση των 2' υδροξυλίων (Nm) και τρίτον οι τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων, εκ των οποίων το μεγαλύτερο μέρος αφορά μεθυλίωσεις σε διάφορες θέσεις (mN) (βλ. εικόνα 2). Στο *E. coli*, οι μετα-μεταγραφικές αυτές τροποποιήσεις καταλύονται από ένζυμα σε αντίθεση με τους ευκαρυώτες, όπου η μεθυλίωση και ψευδοουριδίνωση πραγματοποιούνται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snoRNPs, small nucleolar RNA-protein complexes). Τα αρχαία τέλος, χρησιμοποιούν sRNPs που μοιάζουν πολύ με τα ευκαρυωτικά snoRNPs.

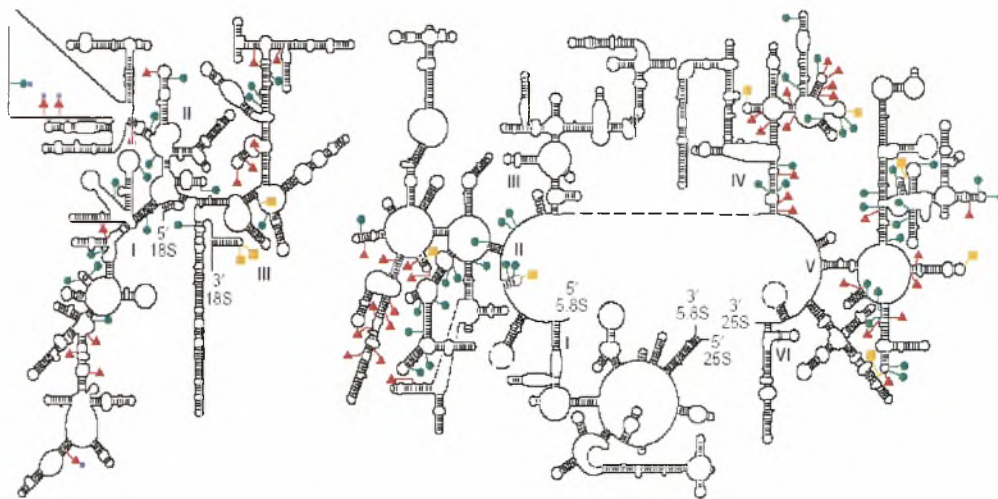


Εικόνα 2: Οι τρεις κύριοι τύποι τροποποίησης των νουκλεοτιδίων rRNA. (a) Μεθυλίωση 2' -OH. (b) Μετατροπή ουριδίνης σε ψευδοουριδίνη και (c) τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων. Τα βέλη υποδεικνύουν πιθανές θέσεις τροποποίησης.

Η έκταση και η πολυπλοκότητα των τροποποιήσεων ποικίλει στα τρία μεγάλα βασιλεια. Παρ' όλα αυτά οι περιοχές όπου συναντώνται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις είναι συντηρημένες (βλ. εικόνες 3,4).

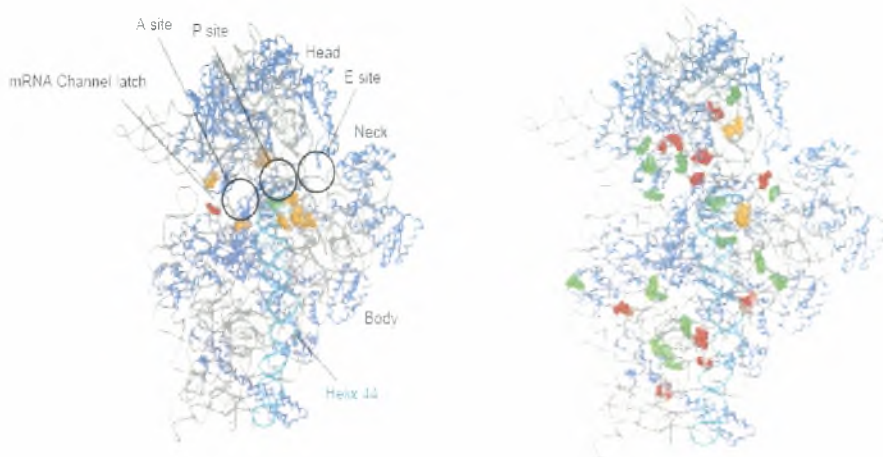


Εικόνα 3: Κατανομή των ριβωσμικών τροποποιήσεων στη δευτεροταγή δομή των 16S & 23S rRNA του *E.coli*. Οι ψευδοουριδινώσεις απεικονίζονται με κόκκινο, οι μεθυλιώσεις με πράσινο και οι λοιπές τροποποιήσεις με πορτοκαλί.



Εικόνα 4: Κατανομή των ριβωσμικών τροποποιήσεων στη δευτεροταγή των 18S, 25S & 5.8S rRNA του *S. cerevisiae*. Οι ψευδοουριδινώσεις απεικονίζονται με κόκκινο, οι μεθυλιώσεις με πράσινο και οι λοιπές τροποποιήσεις με πορτοκαλί.

Και στις δύο ριβωσμικές υπομονάδες, οι τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα στον πυρήνα μακριά από την επιφάνεια όπου συνωστίζονται οι πρωτεΐνες (βλ. εικόνες 5, 6).



Εικόνα 5: Η τριτοταγής δομή της μικρής υπομονάδας των *E.coli* (αριστερά) και *S.cerevisiae* (δεξιά) και ο εντοπισμός των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στο rRNA αυτών. Το rRNA απεικονίζεται με γκρι ενώ οι πρωτεΐνες με μπλε. Στην εικόνα διακρίνονται επίσης και οι σημαντικότερες δομικές και λειτουργικές περιοχές [A-, P- & E- sites, κεφάλι (head), λαιμός (neck), σώμα (body) και η περιοχή όπου διατρέχεται το mRNA (mRNA channel latch)] καθώς και η έλικα 44 (γαλάζιο χρώμα). Οι ψευδοουριδινώσεις απεικονίζονται με κόκκινο, οι μεθυλιώσεις με πράσινο και οι λοιπές τροποποιήσεις με πορτοκαλί.



Εικόνα 6: Η τριτοταγής δομή της μεγάλης υπομονάδας των *E.coli* (αριστερά) και *S.cerevisiae* (δεξιά) και ο εντοπισμός των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στο rRNA αυτών. Το rRNA απεικονίζεται με γκρι ενώ οι πρωτεΐνες με καφέ. Στην εικόνα διακρίνονται και οι σημαντικότερες δομικές και λειτουργικές περιοχές [A-, P- & E- sites και το κανάλι εξόδου της νεοσύστατης πεπτιδικής αλυσίδας] καθώς και η έλικα 69. Οι ψευδοουριδινώσεις απεικονίζονται με κόκκινο, οι μεθυλιώσεις με πράσινο και οι λοιπές τροποποιήσεις με πορτοκαλί.

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των τροποποιήσεων αποτελεί η υψηλή συχνότητα εμφάνισής τους σε περιοχές που διαθέτουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο κατά τη μετάφραση (βλ. εικόνες 5,6 και πίνακα 1). Κατά συνέπεια, βάση της θέσης τους θεωρείται ότι δεν είναι διόλου απίθανο οι τροποποιήσεις αυτές να συμμετέχουν ενεργά στη λειτουργική ικανότητα του ριβοσώματος, ή ακόμα κι αν δεν διαθέτουν ενεργό ρόλο στη διαδικασία της μετάφρασης, φαίνεται ότι διαμορφώνουν το κατάλληλο περιβάλλον για την ομαλή διεξαγωγή της (Decatur W. A. and Fournier M. J., 2002).

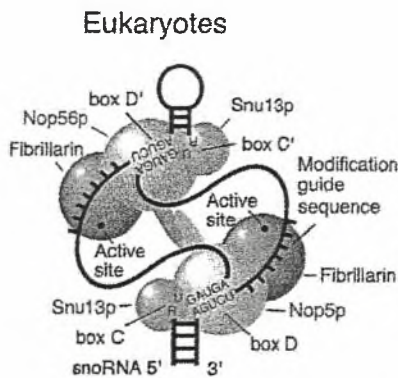
Πίνακας 1: Πιθανή επίδραση των τροποποιήσεων του rRNA στη λειτουργία του ριβοσώματος

| Περιοχή rRNA | Τροποποιημένα νουκλεοτίδια | | Πιθανή επίδραση |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | |
| Μικρή υπομονάδα | | | |
| Σύνολο | 11 | 34 | |
| A site | 1 | 4 | Επιλογή aa-tRNA Διατήρηση πλαισίου ανάγνωσης Μετατόπιση Λήξη |
| P site | 3 | 3 | Έναρξη Διατήρηση πλαισίου ανάγνωσης Μετατόπιση |
| E site | 0 | 2 | Μετατόπιση- έξοδος |
| Έλικα 44 | 3 | 1 | Επιλογή aa-tRNA Επικοινωνία υπομονάδων |
| mRNA latch | 2 | 4 | Έναρξη Μετατόπιση Δέσμευση mRNA |
| Γέφυρες σύνδεσης υπομονάδων | 6 | 8 | Σχηματισμός συμπλόκου Επιλογή aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση |
| Μεγάλη υπομονάδα | | | |
| Σύνολο | 24 | 74 | |
| A site | 5 | 10 | Επιλογή aa-tRNA Τοποθέτηση του 3' άκρου του aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση Διατήρηση πλαισίου ανάγνωσης Λήξη |
| P site | 4 | 3 | Έναρξη Τοποθέτηση 3' άκρου του tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση Λήξη Διατήρηση πλαισίου ανάγνωσης |
| E site | 0 | 3 | Μετατόπιση –έξοδος |
| Κέντρο πεπτιδυλ-τρανφεράσης | 11 | 14 | Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Τοποθέτηση του 3' άκρου του aa-tRNA Μετατόπιση |
| Τούνελ εξόδου | 18 | 37 | Μετακίνηση της νεοσυντιθέμενης πεπτιδικής αλυσίδας Τροποποίηση διαμόρφωσης πεπτιδίου |
| Γέφυρες σύνδεσης υπομονάδων | 5 | 14 | Σχηματισμός συμπλόκου Επιλογή aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση |

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ tRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ

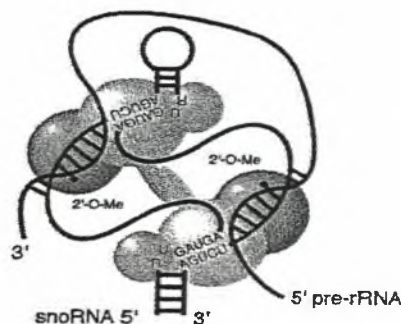
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι τροποποιήσεις του ριβοσωμικού RNA στους ευκαρυώτες καταλύονται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα snoRNPs. Σε αυτά, το περιεχόμενο RNA έχει δράση «οδηγού», δηλαδή είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό και τον καθορισμό του προς τροποποίηση νουκλεοτιδίου, ενώ τελικά η μεθυλίωση/ψευδοουριδίνωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από μια από τις συστατικές πρωτεΐνες. Επί πρόσθετα τα snoRNAs έχουν μετα-μεταγραφική δράση στην ωρίμανση των rRNAs και άλλων RNAs του πυρηνίσκου. Αρκετά από αυτά συμμετέχουν στην διάσπαση του pre-rRNA και θεωρούνται ότι δρουν ως σαπερόνες (Samarsky D.A. et al 1999)

Όσον αφορά τις μεθυλώσεις του rRNA στους ευκαρυώτες, τα υπεύθυνα snoRNPs ονομάζονται box C/D snoRNPs. Αυτά περιέχουν 4 πρωτεΐνες: την Fibrillarin, η οποία καταλύει την αντίδραση μεταφοράς της μεθυλομάδας, τις Nop56p & Nop58p, δυο πρωτεΐνες με παρόμοια ακολουθία και την Snu13p/15.5K, η οποία εντοπίζεται και στα box C/D snoRNPs αλλά και στο U4 spliceosomal snRNP (βλ. εικόνα 7). Κάθε box C/D snoRNP περιέχει μια ή δύο αλληλουχίες RNA που σχηματίζουν δίκλωνες αλυσίδες μήκους 10-20 bp με την περιοχή του rRNA που περιλαμβάνει και τη θέση στόχο μεθυλίωσης (Fatica A. and Tollervey D., 2003). Η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα στο 5^ο νουκλεοτιδιο άνωθεν του box D ή D' (βλ. εικόνα 8). Βάση αυτού χρησιμοποιήθηκαν φορείς κλωνοποίησης με τροποποιημένες αλληλουχίες οδηγούς snoRNA (Liu B., Ni J., and Fournier M. J., 2001).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της δομής των ευκαρυωτικών box C/D snoRNPs. Τα snoRNAs γενικά περιέχουν συγκεκριμένες περιοχές box C/D & box C'/D', καθεμία εκ των οποίων γειτνιάζει με μια αλληλουχία «οδηγό» της μεθυλίωσης δίνοντας μια ψευδο-συμμετρική δομή. Θεωρείται ότι κι οι πρωτεΐνες λαμβάνουν μια συμμετρική δομή στο χώρο. Οι πολύ συγγενικές Nop56p και Nop58p σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές και η αλληλουχία «οδηγός» είναι εμβαπτισμένη στη διεπιφάνεια των Nop58p-Fibrillarin.

Eukaryotes



Εικόνα 8: Το rRNA στόχος σχηματίζει διπλή έλικα με το snoRNA του box C/D snoRNP και η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα στο 5^ο νουκλεοτίδιο άνωθεν του box D και D'. Για την επίτευξη της μεθυλίωσης το RNA στόχος πρέπει να τοποθετηθεί με ακρίβεια έναντι του ενεργού κέντρου της Fibrillarín. Η ακριβής τοποθέτηση επιτυγχάνεται αφενός μεν από τη συμπληρωματικότητα της αλληλουχίας οδηγού με το RNA στόχο, αφετέρου από τις συστατικές πρωτεΐνες.

ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Οι περισσότερες μελέτες για την επίδραση των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στην ακρίβεια της μετάφρασης επικεντρώνονται στα μόρια του tRNA. Οι τροποποιήσεις που υπόκεινται τα νουκλεοτίδια αυτών είναι περισσότερες έναντι εκείνων του rRNA και μέχρι σήμερα απαριθμούνται γύρω στις εκατό (Agtris F.P, 1996).

Οι γενικότερες επιδράσεις των τροποποιήσεων στα μόρια του tRNA αφορούν τη σταθεροποίηση της δομής τους. Η σταθεροποίηση ενισχύεται μέσω της αύξησης των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν, της δέσμευσης μεταλλικών ιόντων και της τροποποίησης της κινητικότητας των νουκλεοτιδίων. Επί πρόσθετα η μεθυλίωση των νουκλεοτιδίων προστατεύει τα μόρια του tRNA από την ενδονουκλεοτική αποδόμηση τους (Motorin Y. and Grosjean H., 1998).

Πέρα όμως από τις επιδράσεις στη δομή του μορίου, οι τροποποιήσεις όπως προαναφέρθηκε συνεισφέρουν και στην ακρίβεια με την οποία τα μόρια tRNA αποκωδικοποιούν το μήνυμα που φέρει το mRNA (Agtris F.P., 2004). Παράδειγμα αποτελούν οι ποικίλες τροποποιήσεις που υπόκεινται τα νουκλεοτίδια των θέσεων 34 του αντικωδικονίου και 37-το αμέσως επόμενο του τελευταίου νουκλεοτιδίου του αντικωδικονίου. Σε έρευνα αναφέρεται ότι οι τροποποιήσεις αρκετών μορίων tRNA στις θέσεις αυτές συνεισφέρουν στην ορθή αποκωδικοποίηση των κωδικονίων σε αμινοξέα καθώς και στη διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης (Yarian C et al, 2002). Συγκεκριμένα σε δημοσίευμα περί της συνεισφοράς των τροποποιήσεων στη διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης προτείνονται δύο υποθέσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, θεωρείται ότι παρουσία τροποποιήσεων η συγκρότηση του τριμελούς συμπλόκου (αμινοακυλωμένο-tRNA, mRNA, ριβόσωμα) στο A-site καθίσταται ταχύτερη, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το χρόνο παύσης που παρεμβάλλεται για την αποκωδικοποίηση του επόμενου νουκλεοτιδίου. Η δεύτερη υπόθεση υποστηρίζει ότι οι

τροποποιήσεις παρεμποδίζουν άμεσα την ολίσθηση των μορίων tRNA (Urbonavicius J. et al, 2001).

Πέραν της ευεργετικής επίδρασης των τροποποιήσεων στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης, έχει βρεθεί ότι η παρουσία κάποιων τροποποιήσεων δρα ανασταλτικά στην ακρίβεια της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, κάνοντας knock-out το μύκητα *S. cerevisiae* στο γονίδιο *PUS3* που κωδικοποιεί για το ένζυμο που ισομεριώνει την ουριδίνη των θέσεων 38 ή 39 του tRNA σε ψευδοουριδίνη, προκαλείται μείωση του φαινομένου της μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης +1 καθώς επίσης μειώνεται κι η αναγνώριση κωδικονίων λήξης από κατασταλτικά tRNAs (Lecoite F. et al, 2002).

Τέλος όταν προκλήθηκαν μεθυλίωσεις στις θέσεις 35 και 36 του αντικωδικονίου παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας αποκωδικοποίησης των μορίων tRNA (Agris F.P, 2004). Τα 2'-OH των νουκλεοτιδίων αυτών βρέθηκαν ότι αλληλεπιδρούν με τα A1492 και A1493 του 16S rRNA (αρίθμηση κατά *E. coli*) διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη μετατόπιση του ριβοσώματος.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία, η οποία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Γενετικής και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου PARIS-SUD XI στη Γαλλία, σκοπός είναι η μελέτη των επιδράσεων της μεθυλίωσης του rRNA στην ακρίβεια της αποκωδικοποίησης του mRNA. Η μελέτη των επιδράσεων της μεθυλίωσης αποτελεί ένα μέρος μιας ευρύτερης έρευνας που επιχειρήθηκε από τον καθηγητή κ. Jean-Pierre Rousset σε συνεργασία με τον καθηγητή κ. Maurice J. Fournier του Πανεπιστημίου της Μασαχουσέτης. Στόχος της έρευνας αυτής είναι η ανακάλυψη μιας πολύ πιθανής σύνδεσης μεταξύ των τροποποιήσεων που υπόκειται το rRNA και της ακρίβειας με την οποία το ριβόσωμα αποκωδικοποιεί το μήνυμα του mRNA σε πρωτεΐνες.

Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την ακρίβεια της μετάφρασης σε συνάρτηση με μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις αναφέρονται στο μόριο του tRNA. Η έλλειψη γνώσεων για τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του rRNA αποτέλεσε και το εναρκτήριο έναυσμα της μελέτης. Στο πλαίσιο αυτό, η ερευνητική ομάδα του κ. Fournier κατασκεύασε και χορήγησε στον κ. Rousset τους φορείς μεθυλίωσης που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Από την άλλη πλευρά, η ερευνητική ομάδα του κ. Rousset είχε στη διάθεσή της από παλαιότερες μελέτες της πλασμίδια αναφορές για την ακρίβεια της μετάφρασης (Stahl et al, 1995). Κατά αυτόν τον τρόπο λοιπόν σχεδιάστηκε κι η πειραματική πορεία (βλ. Μέθοδοι).

Οι μεθυλίωσεις που αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας εργασίας εντοπίζονται στην περιοχή βρόγχου της πεπτιδυλοτρανσφεράσης στις θέσεις A2967, U2950, C2817 και A2816 καθώς και στο κέντρο της GTPάσης στη θέση U1257 (εικ. 9, 10).

Τα προς μεθυλίωση νουκλεοτίδια φυσιολογικά δεν υπόκεινται τροποποίηση στο μύκητα *S. cerevisiae*. Οι περιοχές αυτές επιλέχθηκαν καθώς διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ότι η λειτουργία τους καταλύεται κατά κύριο λόγο από το tRNA συστατικό τους. Οπότε η τροποποίηση των ιδιοτήτων των καταλυτικών αυτών κέντρων που δύναται να προκαλέσουν οι μεθυλιώσεις, όπως μπλοκάρισμα δεσμών υδρογόνου και διαταραχή του δυναμικού της δομής, θεωρήθηκε ότι δεν είναι απίθανο να επηρεάζει την ακρίβεια με την οποία το ριβόσωμα αποκωδικοποιεί το μήνυμα του φέρει το mRNA.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

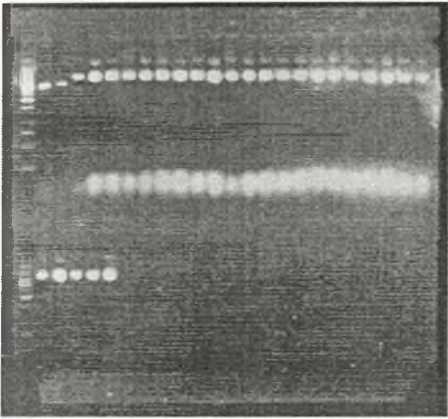
| | |
|-----------------------------------|---|
| Καλλιερρηγρηικά Μέσα | Agarose (Seakem) |
| Triton x 100 (Merck) | BrEt (Merck) |
| Yeast extract (Scharlan) | Bromophenol Blue (Research Organics) |
| NaCl (Merck) | Ομογενοποίηση Κυττάρων- Επεξεργασία Εκχυλίσματος |
| Ampicillin (Sigma) | BSA (Merck) |
| Yeast Nitrogen Base (Sigma) | Magnesium Chloride (Panreak) |
| D-glucose (Panreak) | DTT (Merck) |
| Galactose (Merck) | Glycerol (Panreak) |
| Raffinose (Merck) | PMSF (Alexis) |
| Adenine (Calbiochem) | Cocktail protease inhibitors (Euromedex) |
| Uracil (Calbiochem) | Δοκιμή Δραστηκότητας β-γαλακτοσιδάσης |
| Μετασχηματισμοί | Na ₂ HPO ₄ (Merck) |
| LiAC (GFS Chemichals) | NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (Merck) |
| PEG4000 (Merck) | KCl (Merck) |
| ss-carrier DNA (Clontech) | MgSO ₄ 7H ₂ O (Panreak) |
| Απομόνωση Πλασμυδιακού DNA | β-mercaptoethanol (Riedel-de Haen) |
| EDTA (Panreak) | ONPG (Calbiochem) |
| Tris (Merck) | Na ₂ CO ₃ (Merck) |
| RNase -DNase free (Qiagen) | Δοκιμή Δραστηκότητας λουσιφεράσης |
| NaOH (Merck) | ATP (Bioline) |
| SDS (Sigma) | Luciferin (ProMega) |
| Πηκτική ηλεκτροφόρησης | |
| TBE (AppliChem) | |

ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΟΡΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης της μεθυλίωσης καταλοίπων tRNA στην ακρίβεια της αποκωδικοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν δυο ειδών φορείς κλωνοποίησης. Το πρώτο είδος αφορούσε πλασμίδια που παρουσία γαλακτόζης προκαλούν μεθυλίωση νουκλεοτιδίων στο ριβοσωμικό RNA. Το δεύτερο είδος αποτελείται από τα πλασμίδια αναφορές για την ακρίβεια της μετάφρασης-των φαινομένων της μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης -1 και της αποτελεσματικότητας του σήματος λήξης.

Σε πρώτη φάση, βακτήρια *E. coli* μετασχηματίστηκαν με τους φορείς μεθυλίωσης και κατόπιν καλλιέργειας των, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA (εικ. 11).



Εικόνα 11: Πηκτική ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη απόμονωμένου πλασμιδιακού DNA από *E.coli*. Στο πρώτο πηγαδάκι έτρεξε το Ladder DNA, στη θέση 2-3 το control και στα υπόλοιπα οι διάφοροι φορείς μεθυλίωσης.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί ειδικών στελεχών *S. cerevisiae* με ένα πλασμίδιο μεθυλίωσης και ένα πλασμίδιο αναφοράς τη φορά. Δεδομένου των 5 διαφορετικών θέσεων μεθυλίωσης (+1 πλασμίδιο μάρτυρας) και των 5 πλασμιδίων αναφοράς πραγματοποιήθηκαν συνολικά 30 μετασχηματισμοί (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μετασχηματισμοί του *S. cerevisiae* με τα πλασμίδια αναφοράς (στήλες) και τους φορείς μεθυλίωσης (γραμμές).

| | pAC TQ | pAC HIV-1 | pAC TAG | pAC TGA | pAC TAA |
|--------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| pRS314 | pRS314 + pAC TQ | pRS314 + pAC HIV | pRS314 + pAC TAG | pRS314 + pAC TGA | pRS314 + pAC TAA |
| pBL233 | pBL233 + pAC TQ | pBL233 + pAC HIV | pBL233 + pAC TAG | pBL233 + pAC TGA | pBL233 + pAC TAA |
| pBL232 | pBL232 + pAC TQ | pBL232 + pAC HIV | pBL232 + pAC TAG | pBL232 + pAC TGA | pBL232 + pAC TAA |
| pBL226 | pBL226 + pAC TQ | pBL226 + pAC HIV | pBL226 + pAC TAG | pBL226 + pAC TGA | pBL226 + pAC TAA |
| pBL163 | pBL163 + pAC TQ | pBL163 + pAC HIV | pBL163 + pAC TAG | pBL163 + pAC TGA | pBL163 + pAC TAA |
| pBL162 | pBL162 + pAC TQ | pBL162 + pAC HIV | pBL162 + pAC TAG | pBL162 + pAC TGA | pBL162 + pAC TAA |

Από όλα τα μετασχηματισμένα στελέχη του μύκητα *S. cerevisiae* πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες (καλλιέργειες 1) που επώστηκαν σε καλλιεργητικό μέσο που περιείχε ραφινόζη (πίνακας 3) υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 30°C για 2 μέρες μέχρι και την στατική φάση ανάπτυξής τους. Η αύξηση των στελεχών παρακολουθείτο με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας. Η στατική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας αντιστοιχεί σε $OD_{600nm}=7-8$. Από τις καλλιέργειες αυτές παρασκευάζονταν νέες καλλιέργειες (καλλιέργειες 2) με τη λήψη 100-200μl εναιωρήματος κυττάρων στα οποίο προσθέτονταν θρεπτικό υλικό που περιείχε γαλακτόζη και αφήνονταν έως την λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους ($OD_{600nm}=1.5-3$) υπό ανάδευση στους 30°C.

Πίνακας 3: Θρεπτικά υλικά

| Θρεπτικά υλικά υγρών καλλιεργιών <i>S. cerevisiae</i> | |
|---|---|
| Καλλιέργειες 1 | Καλλιέργειες 2 |
| YNB, Ammonium Sulfate, CSM (-Ura, -Trp-, -Leu), 2% Raffinose, Ade, Ura. | YNB, Ammonium Sulfate, CSM (-Ura, -Trp-, -Leu), 2% Galactose, Ade, Ura. |

Πίνακας 4: Σύσταση YNB

| YNB (Yeast Nitrogen Base) χωρίς αμινοξέα | | | | | |
|--|----------|-------------------------------|----------|-------------------|----------|
| p-aminobenzoic acid | 200 μg/L | niacin | 400 μg/L | folic acid | 2 μg/L |
| biotin | 2 μg/L | potassium iodide | 100 μg/L | inositol | 2 mg/L |
| boric acid | 500 μg/L | potassium phosphate monobasic | 1 g/L | magnesium sulfate | 0.5 g/L |
| calcium chloride | 0.1 g/L | pyridoxine HCl | 400 μg/L | manganese sulfate | 400 μg/L |
| calcium pantothenate | 400 μg/L | riboflavin | 200 μg/L | thiamine HCl | 400 μg/L |
| copper sulfate | 40 μg/L | sodium chloride | 0.1 g/L | zinc sulfate | 400 μg/L |
| ferric chloride | 200 μg/L | sodium molybdate | 200 μg/L | pH | 4.5±0.2 |

Τότε τα κύτταρα υπόκειντο ομογενοποίηση και από το εκχύλισμα τους υπολογίζονταν η ενζυμική δραστηριότητα δύο ενζύμων αναφοράς, της β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφεράσης. Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από τον φορέα αναφοράς στο εκάστοτε στέλεχος και ο λόγος των δραστηριοτήτων λουσιφεράση/β-γαλακτοσιδάση υπολογίζονταν δίνοντας μια εκτίμηση για την ακρίβεια της αποκωδικοποίησης.

Για την απόκτηση στατιστικής σημαντικότητας στα αποτελέσματα της έρευνας, από κάθε μετασχηματισμένο στέλεχος πραγματοποιούνταν καλλιέργειες 1 και 2 από δυο διαφορετικούς κλώνους τη φορά και η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 5 φορές. Κατόπιν οι

λόγοι δραστηριότητας συγκρίνονταν με αυτούς των μαρτύρων βάση του Mann-Whitney test (*u-test*). Πρόκειται για μια δοκιμασία ομογένειας δύο ανεξάρτητων δειγμάτων και αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα μη παραμετρικά τεστ. Στηρίζεται στο διατάξιμο του χαρακτηριστικού που εξετάζεται και ελέγχεται αν τα δύο δείγματα παρουσιάζουν την ίδια κατανομή (Κουινιάς Σ. et al, in:«Εισαγωγή στην Στατιστική»).

ΣΤΕΛΕΧΗ *E. coli* ΚΑΙ *S. cerevisiae*

Πίνακας 5: Στελέχη *E. coli*

| Στέλεχος | Γενότυπος |
|----------------|--|
| <i>E. coli</i> | |
| DH5α | F, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>argF-lacZ γα</i>)U169, φ80, <i>dllacZΔM15</i> |

Οι καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα σε LB (NaCl 5g/L, Tryptone 10g/L, Yeast Extract 5g/L) στη θερμοκρασία των 37°C υπό ανάδευση για τις υγρές καλλιέργειες. Κατόπιν μετασχηματισμού, η επιλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιείται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει LB και άγαρ 2% στο οποίο προστίθεται αμπικιλίνη (50μg/ml) ως αντιβιοτικό επιλογής.

Πίνακας 6: Στελέχη *S. cerevisiae*

| Στέλεχος | Γενότυπος |
|----------------------|---|
| <i>S. cerevisiae</i> | |
| YS625 | <i>MATa</i> , <i>Ade2-101</i> , <i>trp1-Δ101</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3 112</i> , <i>his3Δ200</i> |

Χρησιμοποιείται YPG (peptone 20g/L, yeast extract 10g/L) ως θρεπτικό υλικό για το μετασχηματισμό των μυκήτων. Για την επιλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιείται επίστρωση σε τρυβλία που περιέχουν YNB (Yeast Nitrogen Base) χωρίς αμινοξέα, 2% D-γλυκόζη, 2% άγαρ καθώς και αδερίνη & ουρακίλη απαραίτητα για την έναρξη της αύξησης του *S. cerevisiae*. Το θρεπτικό υλικό των υγρών καλλιεργειών περιγράφηκε στον πίνακα 3 παραπάνω.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Πλασμίδια Αναφοράς

Περιείχαν μια θέση έναρξης της αντιγραφής για το *E. coli* (OriC) και μια για τον *S. cerevisiae* (2μ) καθώς και δυο γονίδια επιλογής (πίνακας 7). Αποτελούν πλασμίδια pAC (12891bp) (Stahl et al, 1995) που εντοπίζονται σε λίγα αντίγραφα στον πυρήνα.

Πίνακας 7: Πλασμίδια αναφοράς

| Τύπος πλασμιδίου: Πλασμίδια αναφοράς της ακρίβειας αποκωδικοποίησης | | |
|---|----------------------|--|
| Γονίδιο επιλογής | Είδος κυττάρων | Χαρακτηριστικά |
| <i>gene β-lactamase</i> | <i>E. coli</i> | Προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (Amp) |
| <i>LEU2</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Κωδικοποιεί για το δεύτερο ένζυμο στο μεταβολικό δρόμο σύνθεσης λευκίνης (Leu) |

Τα πλασμίδια αναφοράς περιέχουν δύο γονίδια. Το γονίδιο του *E. coli lacZ* που κωδικοποιεί για το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης που εντοπίζεται άνωθεν και το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο λουσιφεράση *luc* σε συνέχεια του *lacZ*. Ακολουθίες που προάγουν τη μη κανονική λήξη της μετάφρασης έχουν εισαχθεί ανάμεσα στα *lacZ* και *luc* γονίδια στα pAC99 πλασμίδια (πίνακας 8, εικόνα 11). Αυτός ο φορέας *lacZ-luc* εκφράζει δύο πρωτεΐνες την β-γαλακτοσιδάση και μια σύντηξη της β-γαλακτοσιδάσης με τη λουσιφεράση με την τελευταία σε συνέχεια της πρώτης.

Με τα πλασμίδια pAC-TMV(TAG), pAC-TMV(TGA) και pAC-TMV(TAA) τα ριβοσώματα που σταματούν τη μετάφραση στο κωδικόνιο λήξης (ανάλογα με το πλασμίδιο) εκφράζουν μόνο τη β-γαλακτοσιδάση, ενώ αυτά που «διαβάζουν» πέρα από το σήμα τερματισμού εκφράζουν επίσης και τη λουσιφεράση. Με παρόμοιο τρόπο το πλασμίδιο pAC-HIV-1 χρησιμοποιείται ως αναφορέας του φαινομένου μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης -1. Τέλος ένα πλασμίδιο μάρτυρας στο οποίο τα δύο γονίδια είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης και δε χωρίζονται από κωδικόνιο λήξης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των σχετικών δραστηριοτήτων των ενζύμων της β-γαλακτοσιδάσης και της λουσιφεράσης όταν αυτές εκφράζονται σε ισομοριακές ποσότητες. Το ποσοστό (%) των φαινομένων της αναποτελεσματικότητας τερματισμού και της μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης καθορίζεται από τη διαίρεση των λόγων λουσιφεράση/β-γαλακτοσιδάση που αποκτήθηκαν από τις δοκιμές ενεργότητας προς το λόγο του μάρτυρα.

Πίνακας 8: Πλασμίδια αναφοράς για την αδυναμία αναγνώρισης του σήματος λήξης.

| Πλασμίδια αναφοράς | Αλληλουχίες (decoding sequences) |
|--------------------|---|
| pAC-TMV (TAG) | GGA ACA CAA TAG CAA TTA CAG G T Q Stop Q L Q |
| pAC-TMV (TGA) | GGA ACA CAA TGA CAA TTA CAG G T Q Stop Q L Q |
| pAC-TMV (TAA) | GGA ACA CAA TAA CAA TTA CAG G T Q Stop Q L Q |
| Πλασμίδιο μάρτυρας | |
| pAC TQ | GGA ACA CAA CAG CAA TTA CAG G T Q Q Q L Q |


```

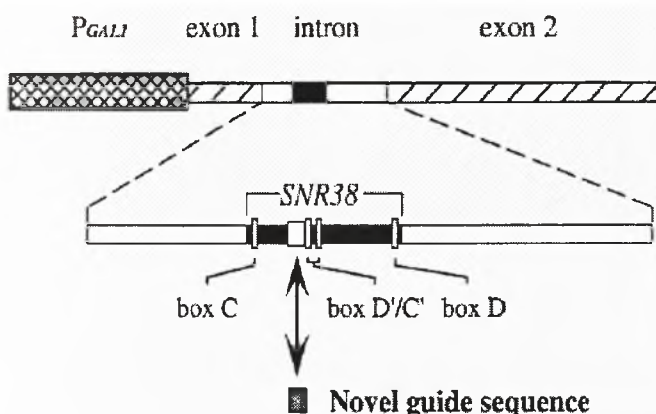
gctagcCAGCCTAATTTTTCAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAACGAAGGCCAGCGAAaggatca
...AlaSerGlnAlaAsnPheLeu
ArgGluAspLeuAlaPheLeuGlnGlyLysAlaArgGluGlySer...

```

Εικόνα 11: Τμήμα αλληλουχίας του pAC HIV-1. Με υπογράμμιση υποδεικνύεται η αλληλουχία σήμα για την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης -1 στο pAC HIV-1. Τα δυο στικτά βέλη συμβολίζουν την περιοχή που αναδιπλώνεται σχηματίζοντας δομή φουρκέτας, το δεύτερο σήμα για την επαγωγή του φαινομένου.

Πλασμίδια μεθυλίωσης νέων θέσεων στο rRNA

Τα πλασμίδια που στοχεύουν στη μεθυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων rRNA περιέχουν το γονίδιο *SNR38* το οποίο φυσιολογικά εντοπίζεται σε ένα ιντρόνιο του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον παράγοντα επιμήκυνσης 4 (*TEF4*). Η κασέτα έκφρασης περιέχει το εξώνιο 1, το ιντρόνιο και ένα τμήμα του εξωνίου 2. Η μεταγραφή υπόκειται έλεγχο από έναν προαγωγέα επαγόμενο από γαλακτόζη. Η μεθυλίωση νέων θέσεων επιτυγχάνεται από την αντικατάσταση της ακολουθίας οδηγού μήκους 13nt άνωθεν του box D' (εικ. 12). Το εκφραζόμενο τμήμα περιέχει επίσης μια απαλοιφή 21nt ώστε να είναι δυνατή η διάκρισή του από το φυσικό snoRNA.



Εικόνα 12: Δομή φορέων μεθυλίωσης. Στην εικόνα διακρίνονται ο επαγόμενος από γαλακτόζη προαγωγέας και η κασέτα έκφρασης. Το *SNR38* περιέχεται σε ιντρόνιο του γονιδίου *TEF4*. Η κασέτα έκφρασης περιέχει το εξώνιο 1, το ιντρόνιο και τμήμα του εξωνίου 2. Αλλάζοντας την αλληλουχία οδηγό επιτεύχθηκε στόχευση της μεθυλίωσης σε νέες θέσεις (Liu B. and Fournier M, 2003).

Πίνακας 9: Φορείς μεθυλίωσης

| Τύπος πλασμιδίου: φορείς μεθυλίωσης νέων καταλοίπων του rRNA | | |
|--|----------------------|--|
| Γονίδιο επιλογής | Είδος κυττάρων | Χαρακτηριστικά |
| <i>gene β-lactamase</i> | <i>E. coli</i> | Προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (Amp) |
| <i>TRP1</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Κωδικοποιεί για ένζυμο στο μεταβολικό δρόμο σύνθεσης τρυπτοφάνης (Trp) |

Στον πίνακα 10 παραθέτονται όλοι οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν κι οι θέσεις που μεθυλιώνουν για τον *S. cerevisiae* και *E. coli*.

Πίνακας 10: Θέσεις στόχοι μεθυλίωσης και οι φορείς αντίστοιχα.

| Φορείς | Κατάλοιπο στόχος στο rRNA (<i>S. cerevisiae</i> / <i>E.coli</i>) | Εντοπισμός καταλοίπου- Λειτουργική περιοχή |
|--------|--|---|
| pRS314 | - | - |
| pBL233 | A2967/A2602 | Περιοχή V μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, κεντρικός βρόγχος PTase |
| pBL232 | U2950/U2585 | Περιοχή V μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, κεντρικός βρόγχος PTase |
| pBL226 | C2817/C2455 | Περιοχή V μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, κεντρικός βρόγχος PTase |
| pBL163 | A2816/A2451 | Περιοχή V μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, κεντρικός βρόγχος PTase |
| PBL162 | U1257/U1083 | Περιοχή II μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, κέντρο GTPase |

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*

Για το μετασχηματισμό των κυττάρων, 20μl επιδεικτικού στελέχους *E. coli* DH5α αναμιγνύονται με 1μl πλασμιδίου στον πάγο όπου και αφήνονται για 30min. Κατόπιν ακολουθεί θερμικό σοκ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 30sec. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 2min κατά την διάρκεια των οποίων τους προσθέτονται 900μl LB και εν συνεχεία επωάζονται στους 37°C για 45min. Τέλος, αυτά επιστρώνονται σε τρυβλία που περιέχουν μέσο επιλογής για τους μετασχηματισμένους κλώνους και τοποθετούνται για επώαση στους 37°C έως ότου γίνουν ορατές οι αποικίες.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *S. cerevisiae*

Πίνακας 11: Διαλύματα μετασχηματισμού

| Διαλύματα | Σύσταση |
|-----------|---|
| LiAc 0.1M | 1ml LiAc 1M (10x); 9ml H ₂ O |
| PEG/LiAc | 800μl PEG4000 (Polyethelene glucol) 50%; 100μl LiAc 1M; 100μl H ₂ O |

Λαμβάνεται καλλιέργεια που έχει επωαστεί για 12-24 ώρες στους 30°C, όγκου 50ml και αφού επιβεβαιωθεί με παρατήρηση στο μικροσκόπιο η απουσία μόλυνσης, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 600nm για το υπολογισμό του OD₆₀₀.

Μετατροπή κυττάρων ζύμης σε επιδεικτικά: Όλος ο όγκος της καλλιέργειας φυγοκεντρείται για 10min (4000rpm). Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml αποστειρωμένο H₂O. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2min (4000rpm), απομάκρυνση του υπερκειμένου και πλύση με 1ml LiAc 0.1M. Επαναλαμβάνεται

φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και τελική επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων με 0.1ml LiAc 0.1M.¹

Κυρίως διαδικασία μετασχηματισμού: Σε πλαστικούς σωλήνες προσθέτονται 1μl του φορέα κλωνοποίησης, 2.5μl carrier DNA (10mg/ml), 25μl εναιωρήματος κυττάρων και 150μl PEG/LiAc. Πραγματοποιείται έντονη ανάδευση και το μίγμα αφήνεται για επώαση για 30-150min στους 30°C. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται για 15-20min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30sec (12000rpm), αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 600μl αποστειρωμένο H₂O. Τέλος τα δείγματα επιστρώνονται σε τρυβλία που περιέχουν μέσο επιλογής και τοποθετούνται για επώαση στους 30°C (~3 μέρες).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ *E. coli*

Πίνακας 12: Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

| Διαλύματα | Σύσταση |
|-----------|---|
| P1 | EDTA 10mM, Tris HCl pH 8 25mM, RNase (DNase free) 50μg/ml |
| P2 | NaOH 0.2M, SDS 1% |
| P3 | Potassium Acetate 3M pH 4.8 |

Καλλιέργεια *E. coli* όγκου 10ml που περιέχει το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA έχει τοποθετηθεί 12-24 ώρες στους 37°C και φυγοκεντρείται (2x2ml) για 30sec (13000rpm). Απομακρύνονται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλυτοποιείται σε 300μl διαλύματος P1. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με προθήκη διαλύματος P2 και ουδετεροποίηση με 300μl διαλύματος P3 με ενδιάμεσες ήπιες αναδεύσεις. Έπεται φυγοκέντρηση για 15min (13000rpm) και λαμβάνεται η υγρή φάση. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 50/49/1 και κατόπιν έντονης ανάδευσης το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30sec (13000 rpm). Λαμβάνεται η υδατική φάση και το DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση για 15min (13000rpm) μετά την προσθήκη 0.8 του όγκου ισοπροπανόλη. Αφαιρείται η αλκοόλη και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 50μl αποστειρωμένο H₂O.

Επιβεβαίωση επιτυχίας απομόνωσης: τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (100ml TBE 1x, 0.8gr agarose, 10μl BrEt). Τα δείγματα προς φόρτωση περιείχαν 1μl DNA, 1μl Bromophenol Blue, glycerol και 2μl TBE.

¹ Σημείωση: οι ποσότητες των προστιθέμενων αντιδραστηρίων αντιστοιχούν σε καλλιέργειες με OD_u=10.

ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *S. cerevisiae* ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Πίνακας 13: Διάλυμα επεξεργασίας εκχυλίσματος

| Διάλυμα | Σύσταση |
|----------------------------------|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα L με BSA 0.1% | Tris PPI pH 7.8 25mM, MgCl ₂ 8mM, DTT 1mM, EDTA 1mM, Triton x 100 1%, glycerol 15%, BSA 0.1% |
| Μίγμα αναστολέων πρωτεασών | Benzamidine (31μg/ml), Pepstatine A (136μg/ml), Leupeptine (26μg/ml), Antipaine (200μg/ml), Chymostatine (200μg/ml) |

4ml καλλιέργειας με OD_{600nm}=1.5-3 φυγοκεντρώνται και αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο. Ακολουθεί προσθήκη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος L με BSA 0.1%, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (πίνακας 13). Προσθέτονται γυάλινα σφαιρίδια και τα κύτταρα τοποθετούνται για ομογενοποίηση υπό έντονη ανάδευση για 1h στους 4°C. Τέλος προσθέτονται 150μl ρυθμιστικού διαλύματος L με BSA 0.1% και τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15min (13000rpm) σε θερμοκρασία 4°C.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

Πίνακας 14: Διάλυμα μέτρησης δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης

| Διαλύματα | Σύσταση |
|----------------------|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα Z | Na ₂ HPO ₄ 0.06M, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0.04M, KCl 0.01M, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.001M, β-mercaptoethanol 0.05M |

Η μέτρηση της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιείται παρουσία 150μl κυτταρικού εκχυλίσματος, 400μl ρυθμιστικού διαλύματος Z και 100μl ONPG (4mg/ml) στους 30°C. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 250μl Na₂CO₃ 1M όταν το δείγμα αρχίζει να εμφανίζει κίτρινο χρώμα.

Ακολουθεί μέτρηση του OD στα 420nm και η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης} = \frac{OD_{420nm} \times 1000}{OD_{600} \times Vol(ml) \times t(min)}$$

ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

Πίνακας 15: Διάλυμα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης

| Διάλυμα | Σύσταση |
|----------------------|--|
| Ρυθμιστικό διάλυμα A | Ρυθμιστικό διάλυμα L, ATP 2x10 ⁻³ M, luciferin 2x10 ⁻⁴ M |

Η λουσιφεράση καταλύει την παραγωγή φωτονίων παρουσία της λουσιφερίνης και ATP. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε 20μl εκχυλίσματος κυττάρων παρουσία 110μl ρυθμιστικού διαλύματος A και 150μl ρυθμιστικού διαλύματος L (σύσταση βλ. πίνακας 11). Η κορυφή της εκπομπής φωτονίων μετρείται στη διάρκεια των 10sec σε ειδικό φωτόμετρο (illuminometer, Lumal LB9501).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την ερμηνεία τελικά των επιδράσεων της εκάστοτε μεθυλίωσης στην ακρίβεια της αποκωδικοποίησης, υπολογίζονται οι λόγοι της δραστικότητας των ενζύμων λουσιφεράση/ β -γαλακτοσιδάση και πραγματοποιείται σύγκριση αυτών παρουσία και απουσία μεθυλίωσης. Οι τιμές του λόγου δραστικότητας που εκτιμήθηκαν κατηγοριοποιούνται και παρουσιάζονται σε έξι πίνακες βάση των θέσεων στόχων μεθυλίωσης (καμία, A2967, U2950, C2817, A2816 & U1257) και των αντίστοιχων φορέων (pRS314, pBL233, pBL162, pBL232, pBL226 & pBL163) που χρησιμοποιήθηκαν. Από αυτούς, ο πίνακας pRS314 (πίνακας 16) αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα pRS314 και δε φέρουν καμία μεθυλίωση στο μόριο του rRNA.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα αναφοράς- Καμία μεθυλίωση

| pRS314 μάρτυρας | Εκτιμώμενος λόγος δραστικότητας Luci/ β -gal | | | | | |
|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 5,4E+08 | 1,6E+09 | 2,3E+09 | 2,0E+09 | 1,9E+09 | 1,1E+09 |
| | 6,3E+08 | 1,8E+09 | 2,3E+09 | 2,0E+09 | 2,0E+09 | 1,2E+09 |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 2,5E+07 | 1,1E+08 | 1,2E+08 | 7,0E+07 | 5,3E+07 | 6,9E+07 |
| | 2,8E+07 | 1,3E+08 | 9,2E+07 | 8,3E+07 | 7,0E+07 | 6,3E+07 |
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 1,0E+08 | 5,8E+08 | 4,6E+08 | 3,2E+08 | 5,0E+08 | 4,0E+08 |
| | 8,5E+07 | 5,5E+08 | 4,2E+08 | 4,5E+08 | 2,0E+08 | 3,8E+08 |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 1,9E+08 | 1,3E+08 | 1,7E+08 | 1,2E+08 | 1,3E+08 | 1,6E+08 |
| | 2,0E+08 | 1,5E+08 | 1,4E+08 | 1,1E+08 | 1,5E+08 | 1,5E+08 |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 2,5E+08 | 1,9E+08 | 1,2E+08 | 2,1E+08 | 1,5E+08 | 1,2E+08 |
| | 2,2E+08 | 2,0E+08 | 1,6E+08 | 1,6E+08 | 1,4E+08 | 1,6E+08 |

Κατά αυτόν τον τρόπο ο πίνακας των λόγων απουσία μεθυλίωσης αποτελεί τον πίνακα αναφοράς βάση του οποίου εκτιμώνται οι τιμές του λόγου δραστικότητας των άλλων πινάκων. Η διαφορετικότητα των λόγων αντανακλά επίδραση στην ακρίβεια της αποκωδικοποίησης του mRNA μηνύματος, είτε επηρεάζοντας τη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης -1 (pAC HIV-1) είτε μεταβάλλοντας το ποσοστό των ριβοσωμάτων που αδυνατούν να αναγνωρίσουν το σήμα λήξης της μετάφρασης (pAC TAG, TGA, TAA). Η ακριβής επίδραση είναι ενδεικτική του μετασχηματισμένου στελέχους *S. cerevisiae* που παρουσιάζει απόκλιση από τους λόγους αναφοράς (pRS314-pAC TQ, pRS314-pAC HIV-1, pRS314-pAC TAG, pRS314-pAC TGA και pRS314-pAC TAA).

Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ U1257 ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΓΤΡασης ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ UGA ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ

Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης των εκτιμώμενων λόγων δραστικότητας των ενζύμων αναφοράς (πίνακες 14, 15 & 16) με το Mann Whitney test, διαπιστώθηκε ότι η μεθυλίωση των καταλοίπων A2967 και U1257 δεν μεταβάλλει το επίπεδο στο οποίο η αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης -1 λαμβάνει χώρα. Παρόμοια, δεν επηρεάζεται η ικανότητα του ριβοσώματος να αναγνωρίσει τα σήματα λήξης των κωδικονίων λήξης UAG και UAA. Αντίθετα, όταν εξετάστηκαν τα επίπεδα που η μετάφραση τερματίζεται στο UGA κωδικόνιο απουσία και παρουσία μεθυλίωσης, αυτά διαπιστώθηκαν διαφορετικά για ένα διάστημα εμπιστοσύνης της τάξεως του 5% και 1% για την περίπτωση της μεθυλίωσης του καταλοίπου A2967 και U1257 αντίστοιχα (βλ. Παράρτημα). Οι λόγοι που παρουσιάζουν απόκλιση σε σχέση με αυτούς του μάρτυρα pRS314 υποδεικνύονται με κόκκινο στους πίνακες.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μεθυλίωσης της βάσης A2967 στο *S.cerevisiae*

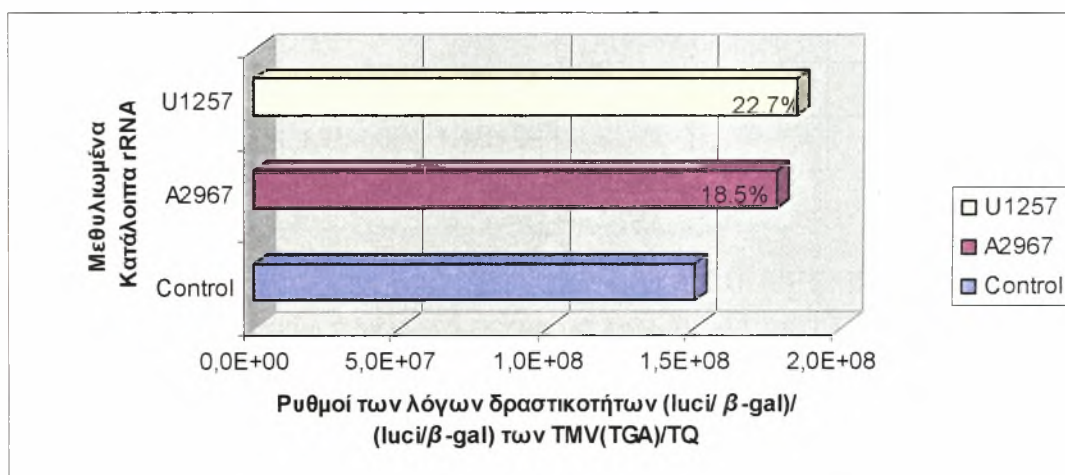
| pBL233 | Εκτιμώμενος λόγος δραστικότητας Luci/ β -gal | | | | | |
|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 5,8E+08 | 1,4E+09 | 2,5E+09 | 1,1E+09 | 1,6E+09 | |
| | 6,1E+08 | 9,4E+08 | 2,0E+09 | 1,7E+09 | 2,2E+09 | |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 2,8E+07 | 5,0E+07 | 1,0E+08 | 5,3E+07 | 7,2E+07 | |
| | 3,3E+07 | 3,9E+07 | 1,0E+08 | 7,4E+07 | 7,4E+07 | |
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 1,5E+08 | 4,4E+08 | 5,3E+08 | 4,6E+08 | 4,6E+08 | |
| | 1,2E+08 | 6,2E+08 | 1,6E+08 | 3,8E+08 | 1,6E+08 | |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 2,5E+08 | 2,3E+08 | 1,4E+08 | 1,9E+08 | 1,4E+08 | 1,8E+08 |
| | 2,3E+08 | 2,4E+08 | 1,2E+08 | 1,8E+08 | 1,5E+08 | 1,5E+08 |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 9,3E+07 | 1,4E+08 | 1,8E+08 | 1,6E+08 | 1,7E+08 | 1,6E+08 |
| | 1,0E+08 | 2,0E+08 | 1,6E+08 | 1,4E+08 | 9,2E+07 | 1,6E+08 |

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μεθυλίωσης της βάσης U1257 στο *S.cerevisiae*

| pBL162 | Εκτιμώμενος λόγος δραστικότητας Luci/ β -gal | | | | | |
|--|--|---------|---------|---------|---------|--|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 6,7E+08 | 1,7E+09 | 1,0E+09 | 1,9E+09 | 9,2E+08 | |
| | 1,7E+08 | 1,9E+09 | 2,6E+09 | 2,0E+09 | 1,9E+09 | |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 3,8E+07 | 7,0E+07 | 1,1E+08 | 7,9E+07 | 8,4E+07 | |
| | 4,1E+07 | 8,5E+07 | 1,2E+08 | 9,6E+07 | 5,7E+07 | |

| | | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 1,2E+08 | 2,2E+08 | 4,3E+08 | 4,0E+08 | 4,8E+08 | |
| | 1,7E+08 | 4,4E+08 | 4,3E+08 | 3,2E+08 | 5,2E+08 | |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 1,5E+08 | 3,1E+08 | 1,5E+08 | 2,1E+08 | 1,8E+08 | 1,8E+08 |
| | 2,0E+08 | 3,0E+08 | 1,9E+08 | 2,1E+08 | 1,2E+08 | 1,7E+08 |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 1,6E+08 | 2,4E+08 | 1,8E+08 | 2,1E+08 | 1,8E+08 | 1,4E+08 |
| | 2,3E+08 | 2,0E+08 | 1,5E+08 | 2,1E+08 | 1,3E+08 | 1,5E+08 |

Συγκεκριμένα και για τα δυο κατάλοιπα η μεθυλίωση οδηγεί σε αύξηση της αναποτελεσματικότητας του τερματισμού κατά 20% (γράφημα 1). Αυτό αντανάκλα την ανικανότητα αρκετού ποσοστού ριβοσωμάτων να αναγνωρίσουν το σήμα λήξης όταν αυτό αντιπροσωπεύεται από το UGA κωδικόνιο λήξης.



Γράφημα 1: Ιστόγραμμα του ρυθμού των λόγων δραστηριότητας των ενζύμων λουσιφεράση/β-γαλακτοσιδάση. Διακρίνοντας το μέσο λόγο δραστηριότητας των ενζύμων όταν παρεμβάλλεται το κωδικόνιο λήξης UGA με τον μέσο λόγο δραστηριότητας όταν τα δύο ένζυμα βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης προκύπτει μια εκτίμηση του επιπέδου της αναποτελεσματικότητας τερματισμού της μετάφρασης απουσία μεθυλίωσης (control), παρουσία των μεθυλιωμένων καταλοίπων A2967 και U1257.

Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ C2817 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΦΕΡΑΣΗΣ ΔΕΝ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Κατόπιν σύγκρισης των λόγων δραστηριοτήτων (πίνακας 19) έπειτα από μεθυλίωση του καταλοίπου C2817 με τους λόγους αναφοράς (πίνακας 14), αυτοί θεωρούνται στατιστικώς ίσοι. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση του συγκεκριμένου καταλοίπου δεν επιδρά καθόλου στο επίπεδο στο οποίο η μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 και η αναποτελεσματικότητα λήξης λαμβάνουν χώρα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Ίσως αυτό να σημαίνει ταυτόχρονα ότι δεν τροποποιεί την ακρίβεια της μετάφρασης γενικότερα, αλλά αυτό

μπορεί να ειπωθεί με εγκυρότητα μόνο εφόσον μελετηθούν και τα υπόλοιπα μη-κανονικά φαινόμενα μετάφρασης («frameshift +1», «hopping», «misreading»).

Πίνακας 19: Αποτελέσματα μεθυλίωσης της βάσης C2817 στο *S. cerevisiae*

| pBL226 | Εκτιμώμενος λόγος δραστηριοτήτων Luci/ β -gal | | | | | |
|--|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 2,0E+09 | 2,0E+09 | 2,4E+09 | 1,3E+09 | 1,4E+09 | 1,7E+09 |
| | 1,7E+09 | 1,7E+09 | 1,3E+09 | 1,5E+09 | 3,8E+09 | 1,4E+09 |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 6,6E+07 | 6,6E+07 | 1,0E+08 | 8,3E+07 | 8,6E+07 | 9,0E+07 |
| | 8,1E+07 | 8,1E+07 | 5,7E+07 | 7,0E+07 | 7,9E+07 | 9,6E+07 |
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 2,9E+08 | 2,9E+08 | 4,7E+08 | 3,6E+08 | 1,1E+08 | 3,1E+08 |
| | 2,0E+08 | 2,0E+08 | 4,5E+08 | 3,4E+08 | 3,5E+08 | 2,1E+08 |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 1,9E+08 | 3,1E+06 | | | | |
| | 1,7E+08 | 1,4E+08 | | | | |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 1,4E+08 | 1,3E+08 | | | | |
| | 1,7E+08 | 1,4E+08 | | | | |

Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 ΚΑΙ A2816 ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΙ ΤΟ ΛΟΓΟ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΤΑΝ ΑΥΤΑ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΙΔΙΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ

Όταν εισήχθησαν στη ζύμη snoRNAs που οδηγούσαν τα ένζυμα μεθυλίωσης στα κατάλοιπα U2950 & A2816 του κεντρικού βρόγχου της πεπτιδυλτρανσφεράσης, παρατηρήθηκε το εξής παράδοξο. Ο λόγος των δραστηριοτήτων των δυο ενζύμων αναφοράς (Luci/ β -gal) παρουσία μεθυλίωσης όταν αυτά είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης χωρίς την παρεμβολή κάποιου κωδικονίου λήξης (κόκκινο στους πίνακες 20, 21) είναι στατιστικώς διαφορετικός από αυτόν απουσία μεθυλίωσης (πίνακας 14, βλ. παράρτημα). Ο λόγος των δραστηριοτήτων της λουσιφεράσης προς β -γαλακτοσιδάσης όταν αυτές εκφράζονται σε ισομοριακές ποσότητες αναμένεται να είναι ο ίδιος ανεξαρτήτα παρεμβολής και αυτό στη συγκεκριμένη περίπτωση δε επιβεβαιώνεται. Αυτό αποτέλεσε σημαντική τροχοπέδη για την μελέτη των ρυθμών που ελήφθησαν αναφορικά για τα φαινόμενα αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και αναποτελεσματικότητας τερματισμού.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα μεθύλισης της βάσης U2950 στο *S.cerevisiae*

| pBL232 | Εκτιμώμενος λόγος δραστηριοτήτων Luci/ β -gal | | | | | | |
|--|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 9,9E+08 | 1,7E+09 | 1,3E+09 | 8,9E+08 | 8,2E+08 | 9,3E+08 | 1,6E+09 |
| | 6,5E+08 | 1,8E+09 | 1,7E+09 | 1,3E+09 | 1,2E+09 | 1,8E+09 | 1,4E+09 |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 3,0E+07 | 1,1E+08 | 8,4E+07 | 3,2E+07 | 5,9E+07 | 6,9E+07 | 7,5E+07 |
| | 6,3E+07 | 7,4E+07 | 7,7E+07 | 5,1E+07 | 5,9E+07 | 7,5E+07 | 7,2E+07 |
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 4,0E+08 | 5,5E+08 | 4,2E+08 | 2,8E+08 | 3,4E+08 | 3,4E+08 | 2,9E+08 |
| | 2,2E+08 | 2,7E+08 | 3,7E+08 | 3,5E+08 | 3,6E+08 | 3,6E+08 | 2,2E+08 |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 1,0E+08 | 1,2E+08 | | | | | |
| | 1,1E+08 | 1,3E+08 | | | | | |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 1,3E+08 | 1,4E+08 | | | | | |
| | 1,4E+08 | 1,5E+08 | | | | | |

Πίνακας 21: Αποτελέσματα μεθύλισης της A2816 στο *S.cerevisiae*

| pBL163 | Εκτιμώμενος λόγος δραστηριοτήτων Luci/ β -gal | | | | | | |
|--|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pAC TQ LacZ-Luc στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης | 1,5E+09 | 2,1E+09 | 9,8E+08 | 6,0E+08 | 1,4E+09 | 1,5E+09 | 1,4E+09 |
| | 8,7E+08 | 1,4E+09 | 1,1E+09 | 6,2E+08 | 1,4E+09 | 9,0E+08 | 1,4E+09 |
| pAC HIV Μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης -1 | 5,4E+07 | 3,8E+07 | 3,6E+07 | 3,7E+07 | 7,3E+07 | 6,0E+07 | 1,8E+07 |
| | 1,4E+07 | 3,8E+07 | 6,1E+07 | 2,9E+07 | 6,0E+07 | 5,2E+06 | 5,0E+07 |
| pAC TAG αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAG | 5,5E+08 | 3,1E+08 | 1,8E+08 | 2,9E+08 | 2,8E+08 | 3,3E+08 | 2,4E+08 |
| | 2,6E+08 | 3,1E+08 | 3,5E+08 | 1,4E+08 | 3,1E+08 | 3,3E+08 | 2,6E+08 |
| pAC TGA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UGA | 1,5E+08 | 1,7E+08 | | | | | |
| | 1,6E+08 | 1,8E+08 | | | | | |
| pAC TAA αναποτελεσματικότητα σήματος λήξης UAA | 1,2E+08 | 1,2E+08 | | | | | |
| | 1,3E+08 | 1,2E+08 | | | | | |

Στον πίνακα 22 παραθέτονται οι μέσοι λόγοι δραστηριοτήτων λουσιφεράσης/ β -γαλακτοσιδάσης για κάθε μεθυλωμένο νουκλεοτίδιο. Επί πρόσθετα αναγράφονται και οι φαινότυποι των μετασχηματισμένων στελεχών, δηλαδή των επιδράσεων της εκάστοτε μεθύλισης.

Πίνακας 22: Μέσοι λόγοι δραστηριοτήτων (luc1/β-gal) κάθε μεθυσμένης μετατόπισης για τα φαινόμενα μετατόπισης πλακίσου ανάγνωσης -1 & αναποτελεσματικότητας τετρατισμού της μετάφρασης. Με κόκκινο υποδεικνύονται οι λόγοι που στατιστικώς κρίνονται διαφορετικοί έναντι των λόγων αναφοράς του μάρτυρα. Επί πρόσθετα παραθέτονται οι φαινότυποι των μεθυσμένων στελεχών.

| Θέση | Εντός πλακίσου ανάγνωσης | Μετατόπιση πλακίσου ανάγνωσης -1 | Αναποτελεσματικότητα λήξης κωδικονίου TAG | Αναποτελεσματικότητα λήξης κωδικονίου TGA | Αναποτελεσματικότητα λήξης κωδικονίου TAA | Φαινότυπος |
|----------|--------------------------|----------------------------------|---|---|---|--|
| Μάρτυρας | 1.9E +09 | 7.7E +07 | 4.3E +08 | 1.5E +08 | 1.6E +08 | Control-φυσιολογική αύξηση |
| A2967 | 1.5E +09 | 6.3E +07 | 4.1E +08 | 1.8E +08 | 1.6E +08 | Λαργή αύξηση, αυξημένος ρυθμός 60S/40S |
| U2950 | 1.2E +09 | 6.6E +07 | 3.5E +08 | 1.2E +08 | 1.4E +08 | Φυσιολογική αύξηση και πρωΐν. ριβοσωμάτων |
| C2817 | 1.7E +09 | 8.1E +07 | 3.0E +08 | 1.5E +08 | 1.4E +08 | Λαργή αύξηση, αυξημένος ρυθμός 60S/40S |
| A2816 | 1.2E +09 | 3.8E +07 | 3.0E +08 | 1.6E +08 | 1.2E +08 | Σοβαρές βλάβες στην αύξηση, παραγωγή ριβοσωμάτων και μετάφραση |
| U1257 | 1.8E +09 | 8.2E +07 | 4.2E +08 | 1.8E +08 | 1.8E +08 | Λαργή αύξηση |

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 & U1257

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο των αποτελεσμάτων, η επίδραση της μεθυλίωσης των καταλοίπων A2967 και U1257 του tRNA έγκειται στην μείωση της ικανότητας του ριβοσώματος να τερματίσει τη μετάφραση στο επίπεδο του UGA κωδικονίου λήξης. Το ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί η μεθυλίωση των συγκεκριμένων καταλοίπων επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης μόνο όταν το σήμα λήξης συνιστάται από το UGA. Ξεκάθαρη απάντηση στο ερώτημα δεν υπάρχει, παρά μόνο υποθέσεις που στηρίζονται στο μηχανισμό του τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης και στην ικανότητα των κωδικονίων λήξης να επάγουν αυτόν.

ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΛΗΞΗΣ ΚΑΙ ΑΣΥΜΦΩΝΙΑ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΚΩΔΙΚΟΝΙΩΝ ΛΗΞΗΣ

Στους ευκαρυώτες είναι γνωστό ότι η μετάφραση τερματίζεται από ένα ετεροδιμερές δύο πρωτεϊνών, του απελευθερωτικού παράγοντα eRF1 & eRF3, οι οποίοι αλληλεπιδρούν *in vivo* (Bertram G. et al, 2001). Ο eRF1 αναγνωρίζει και τα τρία κωδικόνια λήξης και επάγει την υδρόλυση του πεπτιδυλ-tRNA από το ριβόσωμα, προάγοντας την απελευθέρωση του νεοσυντιθέμενου πεπτιδίου. Η αποτελεσματικότητα της λήξης της μετάφρασης στους ευκαρυώτες ενισχύεται από τον GTPase eRF3. Σε απόκριση ενός κωδικονίου λήξης στο A-site, ο σχηματισμός ενός τετραμελούς συμπλόκου που αποτελείται από το ριβόσωμα, τον eRF1, το GTP και τον eRF3 επάγει την απελευθέρωση του πεπτιδίου. Στο μύκητα *S. cerevisiae*, ο eRF1 και ο eRF3 κωδικοποιούνται από γονίδια απαραίτητα (SUP35 & SUP45 αντίστοιχα), μεταλλάξεις των οποίων παράγουν μη νοηματικούς φαινότυπους καταστολής (Kisselev L., Ehrenberg M. and Frolova L., 2003)). Επιπλέον, σημαντικό είναι ότι τα τρία κωδικόνια δε μοιράζονται την ίδια ικανότητα για επαγωγή της λήξης.

Σε ορισμένους οργανισμούς έχει αποδειχθεί η ύπαρξη μιας ασυμμετρίας ως προς τη χρήση των κωδικονίων λήξης. Στους *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* και *D. melanogaster*, το κωδικόνιο UAA είναι το συχνότερα εμφανιζόμενο στο τέλος των γονιδίων, ενώ στον άνθρωπο, το ποντίκι και το *M. tuberculosis*, το UGA (Jacobs et al, 2000). Δημοσιεύσεις των τελευταίων δέκα ετών υποστηρίζουν ότι υπάρχει συστηματική συσχέτιση της συχνότητας ενός κωδικονίου λήξης στο γονιδίωμα και της αποτελεσματικότητάς του για επαγωγή της λήξης της μετάφρασης. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν δείξει ότι όντως το πιο αποτελεσματικό κωδικόνιο λήξης στον *S. cerevisiae* είναι το UAA που είναι και το πιο σύνθητες στο γονιδίωμα του μύκητα-μετά ακολουθούν κατά σειρά τα UGA και UAG (πίνακας 23)-, ενώ αντίθετα στον ποντικό το πλέον σύνθητες UGA (συχνότητα στο γονιδίωμα της τάξεως του 50%) είναι το λιγότερο ικανό για τον τερματισμό της μετάφρασης (Βάση Δεδομένων TransTerm, 1999).

Πίνακας 23: Ασυμμετρία χρήσης κωδικονίων λήξης στο γονιδίωμα του μύκητα *S. cerevisiae* και η ικανότητά τους για επαγωγή του τερματισμού.

| <i>S. cerevisiae</i> | UAA | UAG | UGA | Αποτελεσματικότητα τερματισμού |
|---|-----|-----|-----|--------------------------------|
| Ποσοστό εύρεσης σε κωδικοποιούσες περιοχές | 47% | 23% | 30% | UAA>UGA>UAG |
| Ποσοστό εύρεσης σε μη κωδικοποιούσες περιοχές | 52% | 23% | 24% | |

Βάση του μηχανισμού λήξης λοιπόν, μια υπόθεση για την ερμηνεία της αύξησης της αναποτελεσματικότητας του τερματισμού για το κωδικόνιο λήξης UGA είναι ότι η μεθυλίωση πιθανώς μειώνει την ικανότητα του eRF1 να αναγνωρίσει το συγκεκριμένο σήμα λήξης, δηλαδή μειώνει την αγχιστεία του ως προς το UGA. Αυτό επιτρέπει σε κατασταλτικά μόρια tRNAs να αλληλεπιδράσουν με το κωδικόνιο λήξης και να δώσουν συνέχεια στη φάση της επιμήκυνσης. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται για την περίπτωση της μεθυλίωσης της βάσης A2967 καθώς πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν την υψηλή ομοιότητα στη δομή του eRF1 με αυτή των μορίων tRNA (Nakamura et al, 2000) και είναι επίσης γνωστό ότι το CCA άκρο των τελευταίων τοποθετείται στο κεντρικό βρόγχο της PTase όπου και εντοπίζεται η A2967 (Steitz T.A., Moore P.B., 2003). Η υπόθεση αυτή προσκρούεται όμως στο γεγονός ότι η μεθυλίωση δεν έχει καμία επιρροή στην αναγνώριση του UAG από τον eRF1 που όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι το λιγότερο ικανό κωδικόνιο λήξης στην επαγωγή του τερματισμού στο *S. cerevisiae* άρα και το αναμενόμενα πιο αναποτελεσματικό σήμα λήξης.

Όσον αφορά τη μεθυλίωση του νουκλεοτιδίου U1257 στο κέντρο της GTPασης του ριβοσώματος οι υποθέσεις γίνονται πιο δύσκολες. Το κέντρο της GTPασης απαρτίζεται από ριβοσωμικά στοιχεία που ενισχύουν την χαμηλή εγγενή ενεργότητα των παραγόντων της μετάφρασης που παράλληλα έχουν δράση GTPάσης (Bionnes C. and Ballesta J. P. G., 2000). Η μόνη επιρροή που η μεθυλίωση στη συγκεκριμένη περιοχή μπορούσε να έχει, είναι στον παράγοντα eRF3 και κατ' επέκταση στο σχηματισμό του τετραμελούς συμπλόκου λήξης. Αυτό όμως θα αναμενόταν να έχει ευρεία επίδραση στην αναγνώριση του σήματος λήξης, πράγμα το οποίο δεν υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα.

Σημειωτέο είναι δε, ότι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα της μεθυλίωσης των δυο καταλοίπων είναι η αργή αύξηση των κυττάρων του μύκητα ενδεικτικό της κάποιας επίδρασής τους στη μετάφραση.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 & A2816

Τα αποτελέσματα των ρυθμών ενζυμικής δραστηριότητας για τη μεθυλίωση των νουκλεοτιδίων U2950 & A2816 κρίθηκαν περιοριστικά για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στην αποκωδικοποίηση του mRNA. Αυτό γίνεται αντιληπτό καθώς δεν είναι αποδεκτή οποιαδήποτε εκτίμηση όταν το πρότυπο σε ένα πείραμα δεν παραμένει αναλλοίωτο. Ο φορέας μάρτυρας TQ εξαρχής εξυπηρετούσε τη βάση για τη ορθή διεξαγωγή συμπερασμάτων των φαινομένων όπου οι κανόνες της μετάφρασης παρακάμπτονται.

Στο σημείο αυτό πρέπει να υποτεθεί η εξήγηση αυτού του φαινομένου. Ουσιαστικά τα δύο ένζυμα στο φορέα μάρτυρα προσομοιάζουν σε ένα μεγάλο γονίδιο. Το ερώτημα λοιπόν που τίθεται είναι πώς η μεθυλίωση αυτών των καταλοίπων περιορίζει την ορθή μετάφραση αυτού του «μεγάλου γονιδίου».

ΤΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ U2950 ΚΑΙ A2816 ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΔΙΑΔΡΑΜΑΤΙΖΟΥΝ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Από πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες έχειδειχθεί ότι τα κατάλοιπα U2950 & A2816 είναι τα εγγύτερα στο σημείο σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού (Moore P and Steitz T, 2002). Αυτό τους προσδίδει έναν πιθανό καταλυτικό ρόλο στη σύνθεση του πεπτιδικού δεσμού (εικ. 13), πράγμα το οποίο επιβεβαιώθηκε για την περίπτωση της βάσεως A2816 από μελέτες μεταλλάξεων στο *E. coli*.

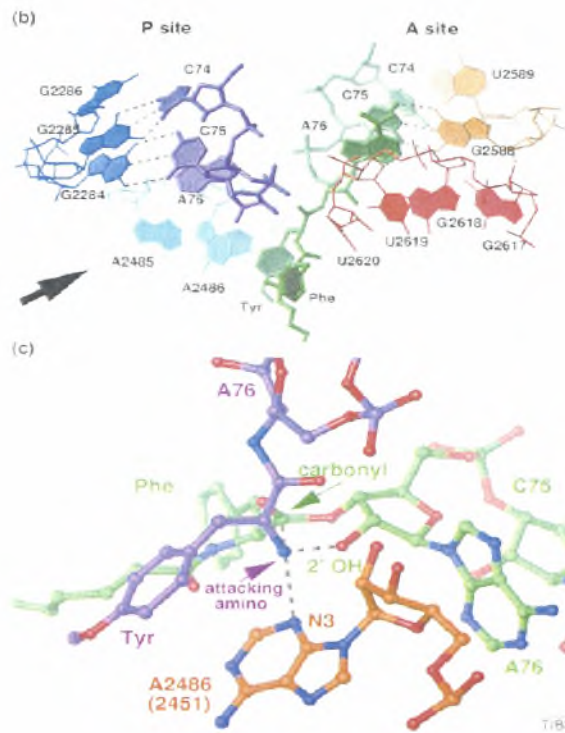
Για τον καταλυτικό ρόλο της βάσεως A2816 κύριος υποψήφιος θεωρείται το N3 της αδενίνης με την υπόθεση ότι υποβοηθά την απόσπαση ενός πρωτονίου από την α-αμινομάδα του αμινοακυλιωμένου μορίου tRNA, προάγοντας το σχηματισμό του δεσμού με το καρβονύλιο του νεοσυντιθέμενου πεπτιδίου του πεπτιδυλ-tRNA (Moore P and Steitz T, 2002). Από την άλλη πλευρά σημαντικό στην κατάλυση του πεπτιδικού δεσμού θεωρείται και το 2'-OH της ριβόζης, δηλαδή ο στόχος της μεθυλίωσης στην παρούσα εργασία (βλ. εικόνα 13).

Ο φαινότυπος των κυττάρων κατόπιν μεθυλίωσης του συγκεκριμένου καταλοίπου του tRNA –σοβαρές βλάβες κατά την ανάπτυξη, αυξημένη θνησιμότητα- συνηγορεί υπέρ της δεύτερης υπόθεσης και επιτρέπει ίσως την εξήγηση του παράδοξου των διαφορετικών ρυθμών δραστηριοτήτων.

Θεωρώντας λοιπόν ότι οι μεθυλίώσεις των U2950 και A2816 μειώνουν το ρυθμό σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού ή τέλος πάντων δυσχεραίνουν την σωστή τοποθέτηση των υποστρωμάτων, κρίνεται πιθανή η αύξηση της συχνότητας του φαινομένου «drop-off». «Drop-off» καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο προκαλείται πρόωρος τερματισμός της μετάφρασης από την αναγνώριση ενός νοηματικού κωδικονίου. Είναι ένα σπάνιο φαινόμενο εξαιτίας της υψηλής εξειδίκευσης των παραγόντων λήξης όμως σε μελέτες αναφέρεται ότι στο επίπεδο των UGG (W) και UAU (Y) το «drop-off» είναι σημαντικό (Freistoffer et al, 2000).

Δεδομένης της δυναμικότητας των αλληλεπιδράσεων των μορίων, ο μη σύντομος σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού δύναται να επιτρέπει στους παράγοντες λήξης την δέσμευση σε νοηματικά, λιγότερο συγγενή κωδικονία. Αυτού του είδους σφάλματα οδηγούν στην πρώιμη αποσύνθεση του ριβοσώματος με αποτέλεσμα είτε την παραγωγή μικρότερου μήκους πολυπεπτιδίων είτε «κολλημένων» ριβοσωμάτων. Στα κολλημένα ριβοσώματα ουσιαστικά το πεπτιδυλ-tRNA δεν έχει αποσπαστεί από το ριβόσωμα, καθιστώντας το μη διαθέσιμο για την περαιτέρω μετάφραση άλλων μεταγράφων. Για την άρση του φαινομένου, οι

οργανισμοί διαθέτουν μια πεπτιδυλ-tRNA υδρολάση η οποία απελευθερώνει τα «κολλημένα» ριβοσώματα.



Εικόνα 13: (α) Η δέσμευση ενός CC-puromycin-phenylalanine-caproic acid-biotin (CC-pmn-pcb: πράσινο) προϊόντος στο βρόγχο A (καφέ) και του απαλκυλωμένου προϊόντος (CCA: μοβ) στο βρόγχο P (μπλε) της πεπτιδυλτρανσφεράσης. Η αρίθμηση αντιστοιχεί σε αυτή του *H. marismortui*. Το N3 της βάσης A2486 (A2816 για το *S.cerevisiae*: γαλάζιο) βρίσκεται πολύ κοντά στο 3'-OH του CCA και η βάση U2620 (U2950 για το *S.cerevisiae*: κόκκινο) πλησίον του νεοσχηματιζόμενου πεπτιδικού δεσμού και του 3'-OH της βάσεως A76. (β) Ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της πεπτιδυλτρανσφεράσης της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας του *H. marismortui* με δεσμευμένα υποστρώματα στα A- και P-sites. Η α-αμινομάδα του υποστρώματος στο A-site (μοβ) τοποθετείται έναντι του καρβονυλικού άνθρακα του πεπτιδίου του υποστρώματος που είναι συνδεδεμένο στο P-site (πράσινο). Πιθανοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του N3 του καταλοίπου A2486 (A2816 για το *S.cerevisiae*) και του 2'-OH της βάσης A76 υποδεικνύονται με το βέλος. Το 2'-OH της βάσης A2486 (A2816 για το *S.cerevisiae*) είναι επίσης πολύ κοντά και μπορεί να αλληλεπιδρά.

Κατά αυτήν την υπόθεση δικαιολογούνται οι μικρότερες δραστηριότητες της λουσιφεράσης κατά την μεθυλίωση των καταλοίπων U2950 και A2816 που οδηγούν αντίστοιχα σε μικρότερους ρυθμούς δραστηριοτήτων. Η επιβεβαίωση της υπόθεσης μπορεί να επιτευχθεί με την πραγματοποίηση πειραμάτων προσδιορισμού της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης. Ωστόσο αντιφατικό κρίνεται το ότι τα μετασχηματισμένα κύτταρα από τον φορέα που οδηγεί σε μεθυλίωση της βάσεως U2950 παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο.

Τέλος, μια τελευταία υπόθεση για την εξήγηση των μειωμένων ρυθμών είναι η επίδραση της μεθυλίωσης των καταλοίπων U2950 και A2816 στην τοποθέτηση μη νοσηματικών αμινοκυλωμένων μορίων tRNA έναντι κωδικονίων. Γνωρίζοντας από πρόσφατες έρευνες το ρόλο του ριβοσωμικού tRNA στη σύνδεση κωδικονίου-αντικωδικονίου (Moore P and Steitz T, 2002), δεν αποκλείεται η διαφορετικότητα στη δομή των δύο καταλοίπων να

έχει μια αρνητική επίδραση στην ακρίβεια αυτή. Η αυξημένη τοποθέτηση μη νοηματικών αμινοακυλιωμένων μορίων tRNAs θα είχε ως αποτέλεσμα της παραγωγή αλλοιωμένων σε σύσταση πολυπεπτιδίων που δεν αποκλείεται να διαθέτουν μειωμένη δραστηριότητα. Φυσιολογικά στο *S. cerevisiae* η συχνότητα τοποθέτησης μη νοηματικών αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA είναι της τάξεως 10^{-4} .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο ερώτημα του αν η μεθυλίωση νουκλεοτιδίων στο tRNA επηρεάζει τελικά την ακρίβεια της μετάφρασης στο μύκητα *S.cerevisiae* έχουν να παρατηρηθούν τα εξής:

- Η μεθυλίωση των καταλοίπων A2967, C2817, U1257 γενικά δεν επηρεάζει την ακρίβεια αποκωδικοποίησης του μηνύματος που φέρει το mRNA.
- Η μεθυλίωση των A2967, C2817 παρουσιάζει μια ελαφρώς αρνητική επίδραση στην αποτελεσματικότητα του τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης όταν το σήμα λήξης συνίσταται από το UGA.
- Η μεθυλίωση των νουκλεοτιδίων U2950, A2816 στον κεντρικό βρόγχο της πεπτιδυλτρανφεράσης επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης κατά τέτοιον τρόπο που οδηγεί στην απόκτηση διαφορετικών ρυθμών δραστηριοτήτων των ενζύμων αναφοράς όταν αυτά εκφράζονται σε ισομοριακές ποσότητες παρουσία και απουσία μεθυλίωσης.
- Αποδεικνύεται ότι γειτονικά νουκλεοτίδια στο tRNA δεν μοιράζονται παρόμοιες ιδιότητες (C2817-A2816).
- Επιβεβαιώνεται εν μέρει ότι κάθε μετα-μεταγραφική τροποποίηση αποφέρει μικρή επίδραση στη λειτουργία του ριβοσώματος.
- Παρότι μειώνεται το επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης (φαινότυποι μεθυλίωσης των A2967, C2817, U1257), πολλές φορές το ριβόσωμα και κατ' επέκταση το κύτταρο διατηρεί την ικανότητά του για την ακρίβεια στην αποκωδικοποίηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agris F. P. (1996) The Importance of Being Modified: Modified Nucleosides and Mg^{2+} in RNA Structure and Function, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **53**, 79-129.
- Agris F. P. (2004) Decoding the genome: a modified view, *Nucleic Acids Res*, **32**, 223-238.
- Aittaleb M., Rashid R., Chen Q., Palmer J.R., Daniels C.J. and Li H. (2003) Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins, *Nature structural Biology*, **10**, 256-263.
- Atkins J.F., Baranov P.V., Fayet O., Herr A.J., Howard M.T., Ivanov I.P., Matsufuji S., Miller W.A., Moore B., Prere M.F. et al (2001) Overriding standard decoding: implications of recoding for ribosome function and enrichment of gene expression, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **LXVI**, 187-201.
- Badis G., Fromont-Racine M. and Jacquier A. (2003) A snoRNA that guides the two most conserved pseudouridine modifications within rRNA confers a growth advantage in yeast, *RNA*, **9**, 771-779.
- Beier H. and Grimm M. (2001) Misreading of termination codons in eukaryotes by natural suppressor tRNAs, *Nucleic Acids Res*, **29**, 4767-4782.
- Beier H., Barciszewska M., Krupp G., Mitnacht R. and Gross, H.J. (1984) UAG readthrough during TMV RNA translation: Isolation and sequence of two tRNAs^{Tyr} with suppressor activity from tobacco plants, *EMBO J.*, **3**, 351-356.
- Bekaert M., Bidou L., Denise A., Duchateau-Nguyen G., Forest J.P., Froidevaux C., Hatin I., Rousset J.P. and Termier M. (2003) Towards a computational model for -1 eukaryotic frameshifting sites, *Bioinformatics*, **19**, 327-335.
- Bertram G., Innes S., Minella O., Richardson J.P. and Stansfield I. (2001) Endless possibilities : translation termination and stop codon recognition, *Microbiology*, **147**, 255-269.
- Bidou L., Stahl G., Hatin I., Namy O., Rousset J.P. and Farabaugh P.J. (2000) Nonsense-mediated decay mutants do not affect programmed -1 frameshifting, *RNA*, **6**, 952-961.
- Bonnerot C., Pintard L. and Lutfalla G. (2003) Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast, *Molecular Cell*, **12**, 1309-1315.
- Brierley I. and Pennell S. (2001) Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic -1 ribosomal frameshifting, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **LXVI**, 233-248.
- Briones C. and Ballesta J. P.G. (2000) Conformational changes induced in the *Saccharomyces cerevisiae* GTPase associated rRNA by ribosomal stalk components and a translocation inhibitor, *Nucleic Acids Res*, **28**, 4497-4505.

- Chandler M. and Fayet O. (1993) Translational frameshifting in the control of bacteria, *Mol. Microbiol.*, **7**, 479-503.
- Decatur W. A. and Fournier M. J. (2002) rRNA modifications and ribosome function, *Trends in biochemical Sciences*, **27**, 344-350.
- Dragon F., Filipowicz W. (2001) snoRNAs: Biogenesis Structure and Function, *Nature Publishing Group*
- Driscoll M. D. and Copeland R. P. (2003) Mechanism and Regulation of Selenoprotein Synthesis, *Annu. Rev. Nutr.*, **23**, 17-40.
- Fatica A. and Tollervey D. (2003) Insights into the structure and function of a guide RNP, *Nature structural biology*, **10**, 237-239
- Fearon K., McClendon T.D., Oroszlan S., Rein A. and Levin J.G. (1990) Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at gag-pol junction of Moloney murine leukaemia virus, *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 8860-8863.
- Feng Y.X., Hatfield D.L., Rein A. and Levin J.G. (1989) Translational readthrough of the murine leukemia virus *gag* gene amber codon does not require virus-induced alteration of tRNA, *J. Virol*, **63**, 2405-2410.
- Freistroffer D.V., Kwiatkowski M., Buckingham R.H. and Ehrenberg M. (2000) The accuracy of codon recognition by polypeptide release factors, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 2046-2051.
- Jacks T., Power M.D., Masiarz F.R., Luciw P.A., Barr P.J. and Varmus H.E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression, *Nature*, **331**, 280-283.
- Jacobs G.H., Stockwell P.A., Schrieber M.J., Tate W.P. and Brown C.M. (2000) Transterm: a database of messenger RNA components and signals, *Nucleic Acids Res*, **28**, 293-295.
- King T.H., Decatur W.A., Bertrand E., Maxwell E.S. and Fournier M. (2001) A Well-Connected and Conserved Nucleoplasmic Helicase Is Required for Production of Box C/D and H/ACA snoRNPs and Localization of snoRNP Proteins, *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 7731-7746.
- King T.H., Liu B., McCully R.R. and Fournier M.J. (2003) Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs that form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center, *Molecular Cell*, **11**, 425-435.
- Kisselev L., Ehrenberg M. and Frolova L. (2003) Termination of translation : interplay of mRNA, rRNAs and release factors?, *EMBO J*, **22**, 175-182.
- Lecointe F., Namy O., Hatin I., Simos G., Rousset J.P. and Grosjean H. (2002) Lack of Pseudouridine 38/39 in the Anticodon Arm of Yeast Cytoplasmic tRNA Decreases in Vivo Recoding Efficiency, *The journal of biological chemistry*, **277**, 30445-30453.

- Liu B., Ni J., and Fournier M. J. (2001) Probing RNA in Vivo with Methylation Guide Small Nucleolar RNAs, *Methods*, **23**, 276-286.
- Lowe T. M. and Eddy S. R. (1999) A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast, *Science*, **283**, 1168-1171.
- Meulewater F., Seurinck J. and Van Emmelo, J. (1990) Genome structure of tobacco necrosis virus strain A, *Virology*, **177**, 699-709.
- Miller W.A., Waterhouse P.M. and Gerlach W.L. (1988) Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA, *Nucleic Acids Res*, **16**, 6097-6111.
- Moore P and Steitz T, 2002, The involvement of RNA in ribosome function, *Nature*, Vol. **418**, 229-235.
- Motorin Y. and Grosjean H. (1999) tRNA modification, *Encyclopedia of Life Science*.
- Nakamura Y., Ito K. and Ehrenberg M. (2000) Mimicry grasps reality in translation termination, *Cell*, **101**, 349-352.
- Namy O., Duchateau-Nguyen G., Hatin I., Hermann-Le Denmat S., Termier M. and Rousset J.P. (2003) Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res*, **31**, 2289-2296.
- Namy O., Hatin I. and Rousset J.P. (2001) Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination, *EMBO reports*, **2**, 787-793.
- Namy O., Hatin I., Stahl G., Liu H., Barnay S., Bidou L. and Rousset J.P. (2002) Gene Overexpression as a Tool for Identifying New *trans*-Acting Factors involved in Translation Termination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **161**, 584-594.
- Namy O., Rousset J.P., Naphthine S. and Brierley I. (2004) Reprogrammed Genetic Decoding in Cellular Gene Expression, *Molecular Cell*, **13**, 157-168.
- Namy Olivier, Duchateau-Nguyen G. and Rousset J.P. (2002) Translation readthrough of the *PDE2* stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiology*, **43**, 641-652.
- Plant E.P., Jacobs K.L., Harger J.W., Meskauskas A., Jacobs, J.L., Baxter J.L., Petrov A.N. and Dinman J.D. (2003) The 9 Angstrom solution: How mRNA pseudoknots promote efficient programmed -1 ribosomal frameshifting, *RNA*, **9**, 168-174.
- Samarsky D.A. and Fournier M.J. (1999) A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, **27**, 161-164.
- Samarsky D.A., Ferbeyre G., Bertrand E., Singer R.H., Cedergren R. and Fournier M. (1999) A small nucleolar RNA: ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target *in vivo* with near-perfect efficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 6609-6614.
- Skuzeski J.M., Nichols L.M., Gesteland R.F. and Atkins J.F. (1991) The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons, *J Mol Biol*, **218**, 365-373.
- Stahl G., Ben Salem S., Li Z., McCarty G., Raman A., Shah M. and Farabaugh P.J. (2001), Programmed +1 translational frameshifting in the yeast *S. cerevisiae* results from

disruption of translational error correction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **LXVI**, 2249-2258.

- Staple W.D. and Butcher S.E. (2003) Solution structure of HIV-1 frameshift inducing stem-loop RNA, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4326-4331.
- Steitz T.A., Moore P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme, *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 411-418.
- Tollervey D., Lenthonen H., Jansen R., Kern H. and Hurt E. C. (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation and ribosome assembly, *Cell*, **72**, 443-457.
- Ugak, M., Tomiyama M., Kakutani T., Hidaka S., Kiguchi T., Nagata R., Sato T., Motoyoshi F. and Nishiguchi M. (1991) The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA, *J. Gen Virol.*
- Urbonavicius J., Qian Q., Durand M. B. J., Hagervall G. T. and Bjork R. G. (2001), Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications, *EMBO J*, **20**, 4863-4873.
- Weiss R.B., Dunn D.M., Atkins J.F. and Gesteland R.F. (1987) Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5 and +6 ribosomal frameshifting, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **52**, 687-693.
- Yarian C., Townsend H., Czetkowski W., Sochacka E., Malkiewicz J. A., Guenter R., Miskiewisz A. and Agris F. P. (2002) Accurate Translation of Genetic Code Depends on tRNA Modified Nucleosides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16391-16395.
- Yonishaka Y., Katoh H., Copeland T.D. and Oroszlan S. (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon, *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 1618-1622.
- Zebarjadian Y., King T., Fournier M. J., Clarke L. and Carbon J. (1999) Point mutations in Yeast *CBF5* Can Abolish *in Vivo* Pseudouridylation of rRNA, *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 7461-7472.
- Κούνιας Σ., Κολυβά-Μαχαίρα Φ., Μπαγιατίης Κ., Μπόρα Σ, in: «Εισαγωγή στην Στατιστική», *Εκδόσεις Χριστοδουλίδη*, 361-366.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Mann-Whitney Test (*u*-test)

Questions

Are the two classes identical? H_0

The class 'pRS314 TGA' is it higher than the class 'pBL233 TGA' ? H_1

The class 'pBL233 TGA' is it higher than the class 'pRS314 TGA' ? H_2

Inputs

| Raw values | | Ranks | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| pRS314 TGA | pBL233 TGA | pRS314 TGA | pBL233 TGA |
| 200000000 | 250000000 | 20 | 24 |
| 190000000 | 240000000 | 18.5 | 23 |
| 170000000 | 230000000 | 15 | 21.5 |
| 160000000 | 230000000 | 14 | 21.5 |
| 150000000 | 190000000 | 11 | 18.5 |
| 150000000 | 180000000 | 11 | 16.5 |
| 150000000 | 180000000 | 11 | 16.5 |
| 140000000 | 150000000 | 7 | 11 |
| 130000000 | 150000000 | 4.5 | 11 |
| 130000000 | 140000000 | 4.5 | 7 |
| 120000000 | 140000000 | 2.5 | 7 |
| 110000000 | 120000000 | 1 | 2.5 |

zb=-3.4352341016783
 zb2=3.4352341016783
 pb1=2.8785814423915
 pb2=0.00059219867740603

u-test - Mann-Withney

$U_a = 102.00$

$U_b = 42.00$

Significance for an unilateral test

| 0.05 | 0.025 | 0.01 |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 42 / 102 | 37 / 107 | 31 / 113 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

31 42

42

u-test - *p*-value

- H_0 -

$z = -1.70$

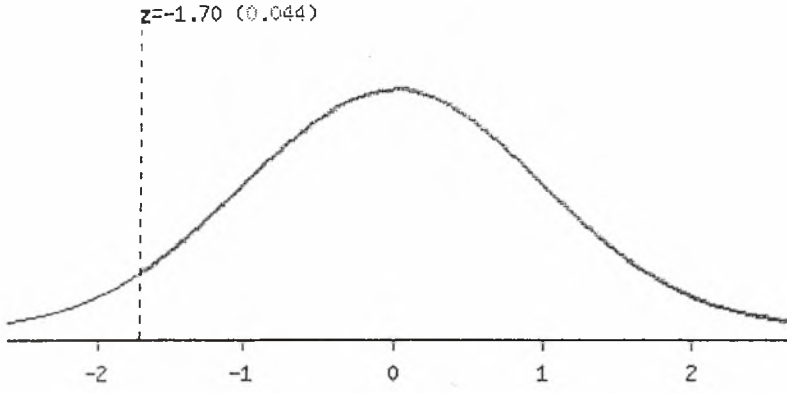
p-value (α) = 0.04427

critical |z| for an unilateral test

| 0.05 | 0.025 | 0.01 | 0.005 | 0.0005 |
|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 | 3.291 |
| ✓ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |

H_2 -

$z = 1.70$
p-value (β) = **0.00000**



Conclusion

Classes are significantly different. ($\alpha = 0.044$)
The class 'pBL233 TGA' is it higher than the class 'pRS314 TGA'. ($\pi = 1.000$)

Mann-Whitney Test (*u*-test)

Questions

Are the two classes identical? H_0

The class 'pRS314 TGA' is it higher than the class 'pBL162 TGA' ? H_1

The class 'pBL162 TGA' is it higher than the class 'pRS314 TGA' ? H_2

Inputs

| Raw values | | Ranks | |
|------------|------------|------------|------------|
| pRS314 TGA | pBL162 TGA | pRS314 TGA | pBL162 TGA |
| 200000000 | 310000000 | 19.5 | 24 |
| 190000000 | 300000000 | 17.5 | 23 |
| 170000000 | 210000000 | 13.5 | 21.5 |
| 160000000 | 210000000 | 12 | 21.5 |
| 150000000 | 200000000 | 9 | 19.5 |
| 150000000 | 190000000 | 9 | 17.5 |
| 150000000 | 180000000 | 9 | 15.5 |
| 140000000 | 180000000 | 6 | 15.5 |
| 130000000 | 170000000 | 4.5 | 13.5 |
| 130000000 | 150000000 | 4.5 | 9 |
| 120000000 | 150000000 | 2.5 | 9 |
| 110000000 | 120000000 | 1 | 2.5 |

zb=-4.8208747477334

zb2=4.8208747477334

pb1=14.94336899485

pb2=1.4758949809355E-06

u-test - Mann-Whitney

$U_a = 114.00$

$U_b = 30.00$

Significance for an unilateral test

| 0.05 | 0.025 | 0.01 |
|----------|----------|----------|
| 42 / 102 | 37 / 107 | 31 / 113 |

31 42

30'

u-test - *p*-value

- H_0 -

$z = -2.40$

p-value (α) = 0.00829

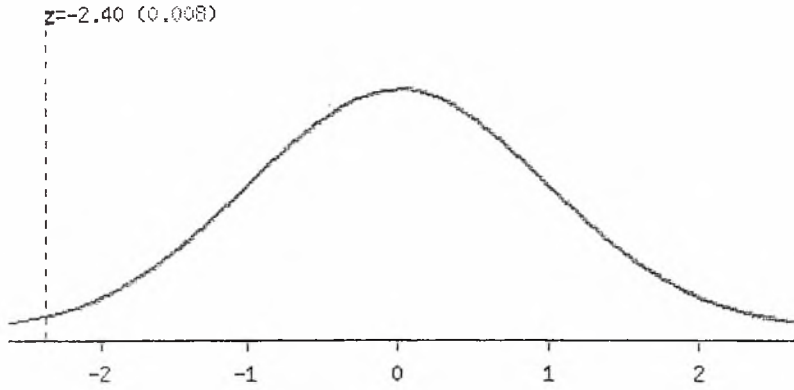
critical |z| for an unilateral test

| | | | | |
|-------|-------|-------|-------|--------|
| 0.05 | 0.025 | 0.01 | 0.005 | 0.0005 |
| 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 | 3.291 |
| ✓ | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ |

H_2 -

$z = 2.40$

p-value (β) = **0.00000**



Conclusion

Classes are significantly different. ($\alpha = 0.008$)

The class 'pBL162 TGA' is it higher than the class 'pRS314 TGA'. ($\pi = 1.000$)

Mann-Whitney Test (*u*-test)

Questions

Are the two classes identical? H_0

The class 'pRS314 TQ' is it higher than the class 'pBL232 TQ' ? H_1

The class 'pBL232 TQ' is it higher than the class 'pRS314 TQ' ? H_2

Inputs

| Raw values | | Ranks | |
|------------|------------|-----------|-----------|
| pRS314 TQ | pBL232 TQ | pRS314 TQ | pBL232 TQ |
| 2300000000 | 1800000000 | 21.5 | 15 |
| 2300000000 | 1800000000 | 21.5 | 15 |
| 2000000000 | 1700000000 | 19 | 12.5 |
| 2000000000 | 1700000000 | 19 | 12.5 |
| 2000000000 | 1300000000 | 19 | 9.5 |
| 1900000000 | 1300000000 | 17 | 9.5 |
| 1800000000 | 1200000000 | 15 | 8 |
| 1600000000 | 9900000000 | 11 | 7 |
| 6300000000 | 9300000000 | 2 | 6 |
| 5400000000 | 8900000000 | 1 | 5 |
| | 8200000000 | | 4 |
| | 6500000000 | | 3 |

zb=2.5715838462436

zb2=-2.5715838462436

pb1=0.010123255103971

pb2=2.1404650794038

u-test - Mann-Whitney

$U_a = 29.00$

$U_b = 91.00$






u-test - *p*-value

- H_0 -

$z = 2.04$

p-value (α) = 0.02047

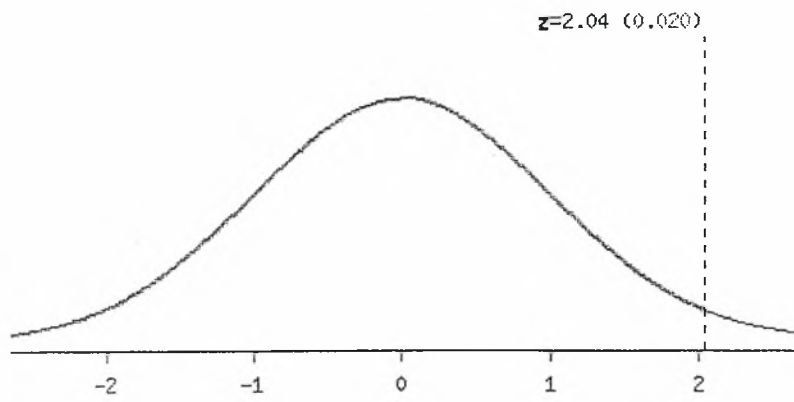
critical $|z|$ for an unilateral test

| 0.05 | 0.025 | 0.01 | 0.005 | 0.0005 |
|--|---|---|---|---|
| 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 | 3.291 |
|  |  |  |  |  |

- H_1 -

$z = -2.04$

p-value (β) = 0.00000



Conclusion

Classes are significantly different. ($\alpha = 0.020$)
The class 'pRS314 TQ' is it higher than the class 'pBL232 TQ'. ($\pi = 1.000$)

Mann-Whitney Test (*u*-test)

Questions

Are the two classes identical? H_0

The class 'pRS314 TQ' is it higher than the class 'pBL163 TQ' ? H_1

The class 'pBL163 TQ' is it higher than the class 'pRS314 TQ' ? H_2

Inputs

| Raw values | | Ranks | |
|------------|------------|-----------|-----------|
| pRS314 TQ | pBL163 TQ | pRS314 TQ | pBL163 TQ |
| 2300000000 | 2100000000 | 21.5 | 20 |
| 2300000000 | 1500000000 | 21.5 | 12.5 |
| 2000000000 | 1500000000 | 18 | 12.5 |
| 2000000000 | 1400000000 | 18 | 10 |
| 2000000000 | 1400000000 | 18 | 10 |
| 1900000000 | 1400000000 | 16 | 10 |
| 1800000000 | 1100000000 | 15 | 8 |
| 1600000000 | 9800000000 | 14 | 7 |
| 6300000000 | 9000000000 | 4 | 6 |
| 5400000000 | 8700000000 | 1 | 5 |
| | 6200000000 | | 3 |
| | 6000000000 | | 2 |

zb=2.7034599409227

zb2=-2.7034599409227

pb1=0.0068619175394288

pb2=2.1965886437979

u-test - Mann-Whitney

$U_a = 28.00$

$U_b = 92.00$

u-test - *p*-value

- H_0 -

$z = 2.11$

p -value (α) = **0.01743**

critical $|z|$ for an unilateral test

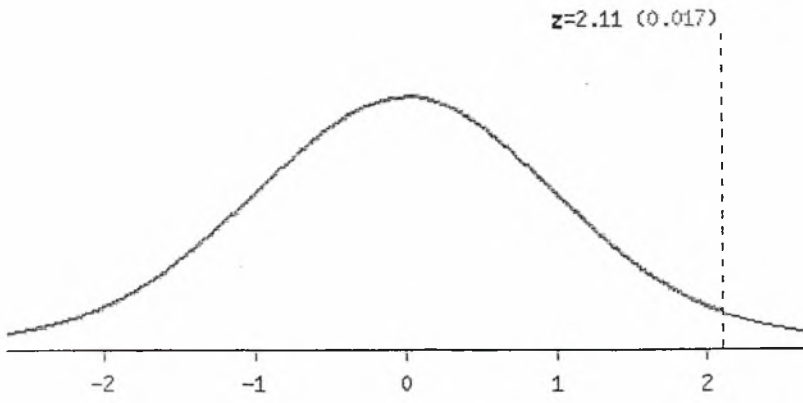
| | | | | |
|-------|-------|-------|-------|--------|
| 0.05 | 0.025 | 0.01 | 0.005 | 0.0005 |
| 1.645 | 1.960 | 2.326 | 2.576 | 3.291 |



- H_1 -

$z = -2.11$

p -value (β) = **0.00000**



Conclusion

Classes are significantly different. ($\alpha = 0.017$)
The class 'pRS314 TQ' is higher than the class 'pBL163 TQ'. ($\pi = 1.000$)